

**Untersuchungen
über das Vorkommen
von Desoxyribonuclease
in Geschlechtssekreten
beim Bullen**

Martin Kinzler

1964

Aus dem Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere
der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Dr. Johannes Brüggemann

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN VON
D E S O X Y R I B O N U C L E A S E
IN GESCHLECHTSSEKRETEN BEIM BULLEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität München

Martin Kinzler
aus Kirchheim - Teck

München 1964

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. L. KOTTER
Referent: Professor Dr. Dr. J. BRÜGGEMANN

Tag der Promotion: 28. Juli 1964

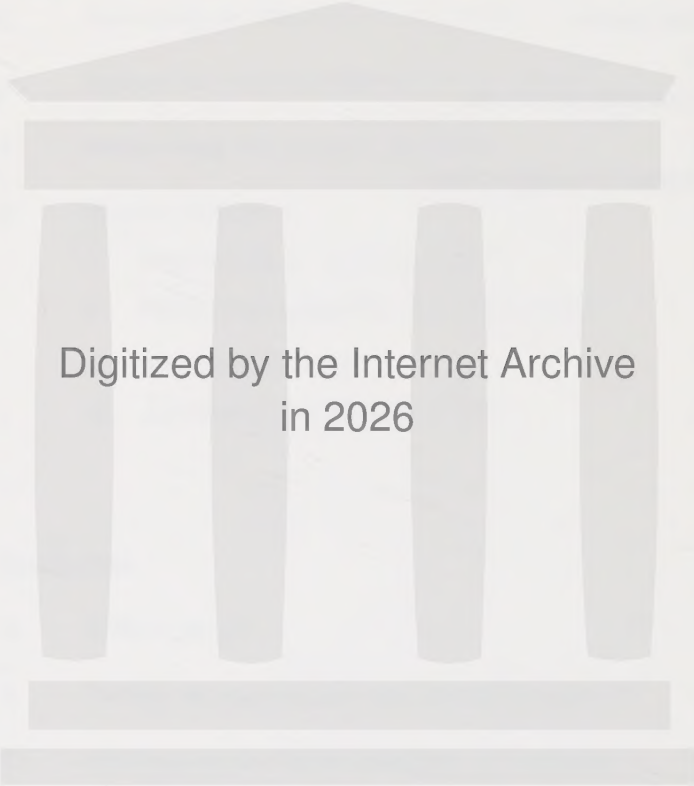


I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. VORBEMERKUNG	7
II. LITERATURTEIL	8
A. Spermien und Sekrete	8
1. Inhaltsstoffe der Spermien	8
2. Spermien-Milieu im männlichen Genitaltrakt	10
B. Desoxyribonucleinsäure (DNS)	14
1. Historisches	14
2. Aufbau der DNS	16
3. Vorkommen der DNS im Zellkern	20
4. Molekulargewichtsbestimmung der DNS	22
5. Abhängigkeit der physikalischen Eigenschaften der DNS	23
C. Desoxyribonuclease (DNase)	24
1. Charakterisierung der DNase	24
2. Vorkommen der DNase	27
3. Wirkung der DNase	28
III. METHODIK	30
A. Herkunft des Untersuchungsmaterials	30
B. Gewinnung der Proben	30

	Seite
1. Sekrete	31
2. Homogenate	32
3. Spermien	33
C. Gewinnung der Desoxyribonucleinsäure	34
D. Auswahl der Bestimmungsmethode für DNase	35
E. Beschreibung der Methode für DNase	38
F. Weitere Methoden	42
1. Bestimmung des pH-Optimums	43
2. Einfluß von Magnesium und Zitrat-Ionen	43
3. Proteinbestimmung	43
4. Auswertung von Meßergebnissen	44
IV. ERGEBNISSE	45
A. Einfluß des pH	45
B. Einfluß der Magnesium- und Zitratkonzentration	46
C. Bestimmung der DNase-Aktivität in verschiedenen Sekreten	49
D. Ergebnisse der Untersuchungen der DNase in Gewebshomogenaten	55
E. Gegenüberstellung der Mittelwerte	59

F.	Ergebnisse der Untersuchungen über die DNase-Aktivität bei drei Bullen nach partieller und totaler Kastration	61
V.	DISKUSSION	64
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	69
	LITERATURVERZEICHNIS	70



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. VORBEMERKUNG

Arbeiten, die sich mit der physiologischen Reifung, sowie dem Altern und Abbau von Spermien im männlichen Genitaltrakt befaßten, haben deutlich gemacht, daß das Milieu in den verschiedenen spermienführenden Abschnitten für die Eigenschaften der Spermien von entscheidendem Einfluß ist. Am Institut für Physiologie und Ernährung der Tiere der Universität München wurde im Rahmen von biochemischen Untersuchungen über den Spermienstoffwechsel beim Rind die Frage aufgeworfen, inwieweit das Enzym Desoxyribonuclease dabei eine Rolle spielt. Voraussetzung für die Beantwortung dieser Frage ist die Kenntnis über das Vorkommen dieses Enzyms in den männlichen Geschlechtssekreten. Da darüber bisher beim Rind keine Mitteilungen vorliegen, wurde mir dies als Thema einer Experimentalaufgabe gestellt.

II. LITER. URTEIL

A. Spermien und Sekrete

1. Inhaltsstoffe der Spermien

Um reine Spermien in ihrem Gehalt an Nucleinsäuren, Protein, Enzymen etc., und damit in ihrer spezifischen Zusammensetzung untersuchen zu können, ist es notwendig, sie von dem jeweiligen Sekret zu trennen. Das geschieht in erster Linie durch Zentrifugieren und Waschen. Durch diese mechanischen Vorgänge werden jedoch an den Spermien Veränderungen hervorgerufen, die möglicherweise zur Folge haben, daß verschiedene Stoffe aus den Spermien in die Umgebung auswandern. (MANN, 1949),

MANN (1949) zerstörte Spermien von Widdern durch Schütteln mit Glasperlen in einem Zerschläger. Dies führte zu einer Zerstörung der Spermienmittelstücke und Spermienchwänze, jedoch nicht der Spermienköpfe. Beim Zentrifugieren ergab sich als Überstand eine gelbliche, opaleszierende Flüssigkeit, die wohl dem Cytoplasma der Spermien entsprach. Das so erhaltene Material war reich an Enzymen. Es enthält unter anderen Enzyme der Fruktolyse, Phosphatasen und dazu den Gesamtkomplex der Cytochrome und Cytochrom-Oxydase, sowie eine sehr aktive Bernsteinsäure-Dehydrogenase.

Auf Grund der Untersuchungen von FELIX u. a. (1972) ist das Cytoplasma von Lachspermien frei von Nucleoproteiden, enthält jedoch geringe Mengen Ribonucleinsäure und einige freie Aminosäuren. ZITTLE und O' DELL (1941) gelang es, mit Hilfe von Ultraschallwellen, Spermienköpfe von Mittelstücken und Schwänzen zu trennen. Nach anschließendem Zentrifugieren und Trocknen wurden u. a. auch die Gehalte der Trockensubstanz an Asche, Stickstoff und Phosphor bestimmt. Dabei erhielten sie folgende Ergebnisse:

Tabelle 1

	mg % Asche	mg % Stickstoff	mg % Phosphor
Spermien (ganz)	1.8	16.4	----
Spermienköpfe	2.0	18.5	2.7
Mittelstücke	1.1	16.0	4.0
Schwanzstücke	1.1	13.6	0.5

Der ermittelte Gehalt an Phosphor in den Spermienköpfen entspricht einem Desoxyribonucleinsäure-Gehalt von 40.5 %.

Desoxyribonucleinsäure (DNS) wurde in allen tierischen Körper- und Samenzellen als ein wesentlicher Bestandteil des Zellkerns festgestellt. Sie setzt sich aus Mononucleotiden zusammen, die ihrerseits aus Phosphorsäure, einem Zucker und einer Purin- oder Pyrimidinbase bestehen (siehe Seite 16). Die Zusammensetzung der DNS ist dabei von einer Tierart zur anderen verschieden, hauptsächlich in Bezug auf das Verhältnis zwischen den einzelnen Purin- und Pyrimidinbasen.

Die Analyse der Basenzusammensetzung ergab für DNS aus Widderspermien ein molares Verhältnis von Guanin zu Adenin, Cytosin und Thymin wie 0.91 : 1.13 : 0.86 : 1.10. Diese Werte wurden mit Hilfe der Papierchromatographie nach der Methode von WYATT (1951) ermittelt. Damit stimmen auch die Werte von ELMES und WHITE (1952) überein, die sie bei Untersuchungen von menschlichen Körper- und Samenzellen erhalten hatten. Geringe Mengen einer weiteren Base, 5-Methylcytosin, wurden von WYATT (1951) in der DNS aus Spermien von Menschen, Bullen, Widdern, Heringen und Seeigeln gefunden; dabei ist anzunehmen, daß sie in adäquater Weise auch bei anderen Arten in Erscheinung tritt.

Über den Funktionszustand der DNS, wie sie in den Spermien vorzuliegen scheint, geben Forschungsergebnisse von BRIL - PETERSEN und WESTENBRINK (1963) Hinweise. Im Gegensatz zu Körperzellen findet in den Spermien keine Proteinsynthese durch die DNS statt. Die DNS ist vielmehr in ein argininreiches Proteingerüst mit schwammähnlicher Struktur eingelagert und fixiert, ohne irgendwelche Reaktionen erkennen zu lassen. Dabei erfüllen die Histone, die in den Körperzellen bei der Proteinsynthese gegenüber der DNS eine regulierende Funktion innehaben, in den Spermien eine gewisse Schutzfunktion.

2. Spermien-Milieu im männlichen Genitaltrakt

Das Milieu hat einen entscheidenden Einfluss auf die Reifung und den Stoffwechsel der Spermien in den verschiedenen Abschnitten. Das einzelne Spermium durchläuft von den Hoden, über Nebenhoden, Ductus deferens bis zur Ejakulation verschiedene Abschnitte. Es verläuft im Heckenteil der Urethra noch die Sekrete der Vesikulardrüsen, Prostata und Samenrezeptordrüsen.

a) Nebenhoden-Schwanz (Cauda epididymidis)

Der Nebenhodenschwanz als Endabschnitt des Nebenhodens dient, neben der weiteren Spermienreifung, hauptsächlich der Spermien-speicherung. Er nimmt dabei eine ähnliche Stellung wie die Ampulle im Endabschnitt des Ductus deferens ein.

Ein erhöhter Spermienstoffwechsel im Nebenhodenschwanz - im Gegensatz zu Nebenhodenkopf und Nebenhodenkörper - setzt auch das Vorhandensein energieliefernder Verbindungen voraus. Der Fruktoseanteil ist jedoch verhältnismäßig niedrig. WHITE und WALES (1961) fanden beim Widder im Inhalt des Nebenhodens durchschnittlich 10 mg% Fruktose und 27 mg% Milchsäure.

Neben den reduzierenden Substanzen findet sich im Nebenhodeninhalt Glycerolphosphoryletholin (GPC) in größeren Mengen. Beim Widder untersuchten SCOTT und Mitarbeiter (1963 a) das Sekret von Nebenhodenkopf und Nebenhodenschwanz und fanden im Nebenhodenkopf Werte von 456,4 bis 538,5 mg% und im Nebenhodenschwanz Werte von 196,4 bis 2186,18 mg% GPC. Allerdings konnten DAWSON, ALANN und WHITE (1957) bei Untersuchungen über GPC keine spezifische Wirkung auf den Stoffwechsel feststellen.

An Mineralstoffen finden sich besonders Kalium und Natrium in den verschiedenen Sekreten in reichlicher Menge. Nach SALISBURY (1957) bilden sie einen wesentlichen Faktor für die Motilität und Aktivität der Spermien. Demnach erfolgt nach Erhöhung des Calciumspiegels eine deutliche

Steigerung der Motilität, die wiederum durch Kalium allein stark gehemmt wird. Eine Verschiebung im gesamten Mineralstoffverhältnis setzt SALISBURY (1957) dem "Reifungsfaktor" gleich, für den von anderen Autoren Schwefel in Form von H_2S , Sulfid, Sulfit oder anderen Schwefelverbindungen verantwortlich gemacht wurde (LARDY, 1953). In diesem Zusammenhang konnte RÖDEL (1955) am hiesigen Institut nachweisen, daß Nebenhodensekret fähig ist, H_2S aus Cystin abzuspalten; es muß demnach eine Cysteinsulphydrase enthalten.

b) Samenleiterampulle

Die Werte über die Zusammensetzung des Ampulleninhalts zeigen eine beachtliche Variationsbreite und dürften nicht unwesentlich mit dem Gehalt an Spermien in Zusammenhang stehen. Der Gehalt an reduzierenden Substanzen ist etwa gleich hoch wie im Inhalt der Nebenhoden und wird von BRANTON (1946) mit 81 bis 94 mg% angegeben. Dabei hat Fruktose, im Gegensatz zum Nebenhoden, einen wesentlichen Anteil. So wurden Fruktosewerte von 80 bis 180 mg% gemessen (LUTWAK-MANN, 1948).

KARG und GASSNER (1961) fanden im Ampulleninhalt von Bullen Ascorbinsäure in einer Konzentration von 8 bis 16.6 mg%. Als mögliche energieliefernde Verbindungen wurden von GASSNER und HOPWOOD (1953) verschiedene Aminosäuren gefunden. Eine relativ starke, Chymotrypsin-ähnliche, proteolytische Aktivität konnte von WALDSCHMIDT, KARG und HOFFMANN (1963) im Ampullenmilieu ermittelt werden. Dabei handelt es sich um ein Enzym, das aus den Spermien zu einem großen Teil in der Ampulle freigesetzt wird.

Bei den Mineralstoffen ist Calcium mit 32 mg% (SALISBURY, 1958) gegenüber Nebenhodeninhalt mit 6.0 mg% wesentlich erhöht. SALISBURY (1958) macht diesen erhöhten Calciumgehalt für die erhöhte Motilität der Ampulenspermien verantwortlich. Natrium ist mit 161 mg% und Kalium mit 240 mg% gegenüber dem Inhalt der Nebenhoden ebenfalls erhöht. (Siehe Seite 13, Tabelle 2)

c) Vesikulardrüsen

Das Sekret der Vesikulardrüsen ist reich an Kohlenhydraten, Zitrat, Proteinen, Aminosäuren und Enzymen. Dazu enthält es noch Vitamine und Mineralstoffe. Mit dem Sekret der Vesikulardrüsen werden den Spermien beträchtliche Mengen an Fruktose und Zitronensäure zugeführt. MANN (1954) gibt für das Sekret der Vesikulardrüsen Fruktosemengen von 340 bis 1 000 mg/100 ml an. BRANTON (1946) fand durchschnittliche Mengen von 588 bis 1036 mg/100 ml. Der Gehalt an Zitronensäure ist beim Bullen höher als bei anderen Tierarten und wird bis zu einer Menge von 1 000 mg/100 ml vorgefunden.

Nach Untersuchungen von MANN (1946) tritt im menschlichen Sperma die Zitronensäure erst mit dem Einsetzen der Pubertät auf, und ist, ebenso wie der Gehalt an Fruktose, von dem Vorhandensein des Testosterons abhängig. Bei Bullen erfolgt nach der Kastration ein rasches Absinken der Fruktose- und Zitronensäure-Konzentration, wie es auch überhaupt zu einer Abnahme der normalen Sekretmenge kommt.

CRAGLE und SALISBURY (1958) untersuchten das Sekret der Vesikulardrüsen auf seinen Gehalt an Mineralstoffen und fanden beim Vergleich mit dem Inhalt von Samenleiterampulle und Nebenhoden einen erhöhten Anteil von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium (siehe Seite 10 Tabelle 2). Das entspricht auch dem erhöhten Gehalt an Mineralstoffen im Samenplasma beim Vergleich zum Ampulleninhalt.

d) Prostata und Bulbourethraldrüsen

Über den prozentualen Anteil der von der Prostata und den Bulbourethraldrüsen gelieferten Sekretbestandteile ist noch ziemlich wenig bekannt. Bei der Prostata ergaben sich Werte von 20 bis 420 mg Zitronensäure/100 ml, die bei normaler Tätigkeit der Testes nur dann wesentlich erniedrigt waren, wenn eine akute oder chronische Entzündung der Prostata vorlag. Als Besonderheit weist der Mineralstoffanteil der Prostata reichliche Mengen an Zink auf, doch liegen darüber noch keine genauen Angaben vor.

e) Samenplasma

Samenplasma erhält man durch Abzentrifugieren der Spermien aus dem Ejakulat. Es ist eine Mischung aller Anteile aus den oben genannten Sekreten. Der Gesamtgehalt an reduzierenden Substanzen, Mineralstoffen, Vitaminen, Aminosäuren, Enzymen und anderen organischen Bestandteilen ergibt sich damit einerseits aus der Zusammensetzung der zugeführten Sekrete, andererseits aus der Menge und der Stoffwechselaktivität der Spermien. Es hat in qualitativer und quantitativer Hinsicht bei den einzelnen Tierarten eine verschiedene spezifische Zusammensetzung.

Tabelle 2

Mineralstoffgehalt in den verschiedenen Abschnitten der
Geschlechtsorgane beim Bullen in mg%
(CRAGLE, SALISBURY und MUNZ, 1958)

	Mg	Ca	Na	K
Hoden	12,5	5	178	373
Nebenhoden	----	6	---	180
Ampulle	8,5	32	137	240
Vesikulardrüsen	17,5	70	251	287
Samenplasma	9,8	24	242	172

f) Wasserstoffionen - Konzentration (pH)

Als Folge der Zusammensetzung des Milieus ergibt sich eine charakteristische Wasserstoffionen - Konzentration. Die nachstehende Übersicht zeigt die pH-Werte von verschiedenen Abschnitten des Genitaltraktes beim Bullen.

Tabelle 2

Hoden	7.1 - 7.8	(REDENZ, 1925)
Nebenhoden-Sekret	6.1	(BRANTON, 1946)
	6.3 - 7.5	(REDENZ, 1925)
Ampullen-Sekret	5.9	(BRANTON, 1946)
	6.8	(LUTWAK-MANN, C. u. ROWSON, 1953)
Vesikulardrüsen- sekret	5.4 - 6.2	(BRANTON, 1946)
	6.3 - 6.5	(SCHERSTEN, 1936)

B. Desoxyribonucleinsäure

Um näher auf die Funktion der Desoxyribonucleinsäure eingehen zu können, ist es notwendig, vorher einige Hauptpunkte über die Struktur und das Vorkommen ihres spezifischen Substrates, der Desoxyribonucleinsäure, zu erläutern.

1. Historisches

Friedrich MIESCHER (1844-1895) gab durch seine Untersuchungen über die einzelnen Bestandteile des Zellkerns den ersten Anstoß zur Erforschung der Nucleinsäuren. Als Ausgangsmaterial benutzte er u. a. Fischspermien, aus denen er den Zellkern isolierte. Daraus erhielt er dann einen Stoff, der bis dahin unbekannt war; er nannte ihn "Nuclein". Durch Hydrolyse dieses Stoffes, der dann als Nucleinsäure definiert wurde, isolierte er auch eine Base, die man später als Thymin identifizierte.

Nach MIESCHER entwickelten andere Forscher Methoden zur Gewinnung von proteinfreier Nucleinsäure aus Hefe und tierischen Geweben, insbesondere aus Thymus. Diese Arbeiten sind besonders von KOSSEL (1894) weitergeführt worden.

In den Jahren um 1930 waren die Forschungen soweit fortgeschritten, daß man zwei in ihren Zuckerkomponenten verschiedene Nucleinsäuren differenzieren konnte. Die eine, die zuerst aus Hefe isoliert wurde, enthielt 1. als Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil, 2. Phosphorsäure und 3. als Zucker eine Pentose, die als Ribose identifiziert wurde. Die andere, Thymusnucleinsäure, enthielt Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil, Phosphorsäure und als Zucker Desoxyribose. Dadurch ergaben sich die heute üblichen Bezeichnungen der beiden Nucleinsäuren als Ribonucleinsäure und Desoxyribonucleinsäure.

Man versuchte zuerst, die beiden Nucleinsäuren als Differenzierungsfaktor für tierische und pflanzliche Zellen zu definieren. Es ergab sich jedoch aus späteren Forschungen, daß hier weder ein deutlicher Unterschied zwischen tierischem und pflanzlichem Bereich, noch zwischen wachsenden und ausgewachsenen Exemplaren bestand. Die Differenzierung der beiden Nucleinsäuren liegt aber innerhalb der Zelle. Dabei sind für Ribonucleinsäure, die hauptsächlich im Zellplasma vorkommt, und für Desoxyribonucleinsäure, die fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist, unterschiedliche Funktionen festzustellen, die in verschiedenen Zellarten eine Verschiebung im Konzentrationsverhältnis mit sich bringen.

Mit Hilfe der quantitativen Ultraviolett-Spektrophotometrie konnten hohe Konzentrationen von Pentose-Polynucleotiden im Cytoplasma von Zellen, die eine hohe Zellteilungsrate aufwiesen, wie z.B. die Gewebe von Embryonen, Zellen von Wurzelspitzen, Tumorgewebe oder Zellen von sezernierenden Drüsen, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden von DAVIDSON und WAYMOUTH (1943) für Embryogewebe bestätigt. Mittels chemischer Methoden konnten sie feststellen, daß in einer ganzen Reihe von Geweben bei Embryonen von Schafen sowohl Ribonucleinsäure, als auch Desoxyribonucleinsäure vorhanden war. Das quantitative Verhältnis dieser beiden Nucleinsäuren wechselt bei verschiedenen Geweben. So ergab sich bei der Isolierung der Nucleinsäure aus Schafsleber ein Verhältnis von Ribonucleinsäure zu Desoxyribonucleinsäure von 3 - 4 : 1. Entsprechend der chemischen Unterschiede ist auch eine Differenzierung ihrer biologischen Funktion gegeben.

Durch histochemische Untersuchungen mit Hilfe der Feulgenfärbung, die spezifisch für DNS ist, konnte dargelegt werden, daß der Zellkern zu einem wesentlichen Anteil (ca. 40 %) aus DNS besteht. Damit wurde die Bedeutung der DNS als Träger der Vererbung erkannt. Die RNS dagegen ist Zellplasma -

Bestandteil und mit der DNS zusammen. Damit kann die Biosynthese der Proteine beteiligt.

2. Aufbau der Desoxyribonucleinsäure (DNS)

a) Primärstruktur

Bei vollständiger Hydrolyse können folgende Grundelemente des DNS-Moleküls nachgewiesen werden:

- 1.) Heterozyklische Basen, denen einerseits der Pyrimidinring an Grund liegt, die Pyrimidinbasen, zum anderen solche, die das Purinringsystem in ihrer Struktur aufweisen, die Purinbasen.
- 2.) Kohlenhydrat in Form der 2 - Desoxyribose und
- 3.) Phosphorsäure.

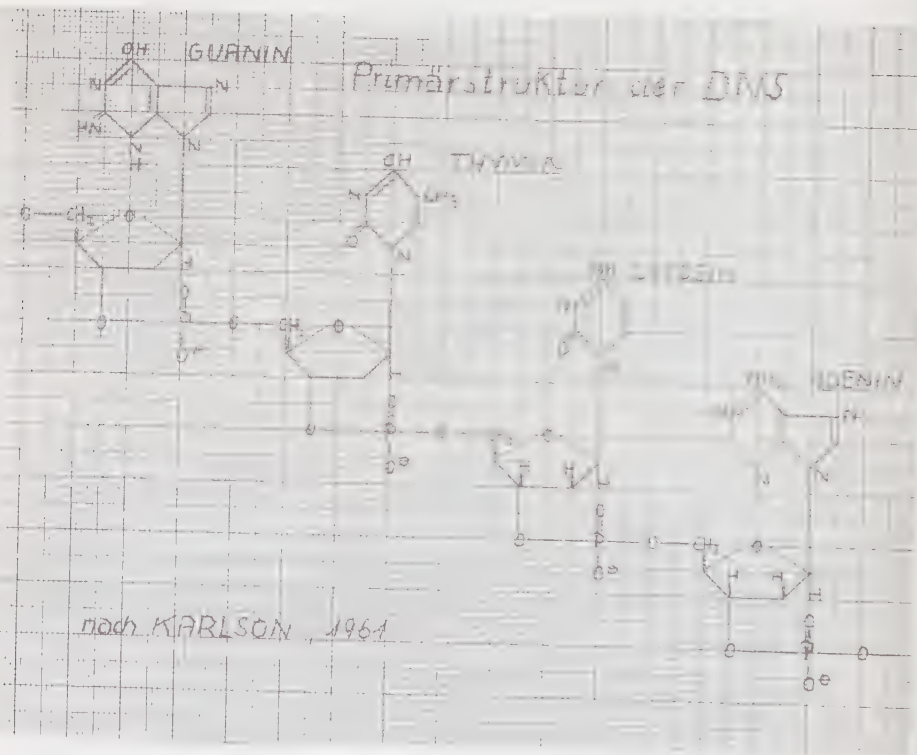
CHARGAFF (1955) stellte nach zahlreichen Untersuchungen an DNS von tierischem, pflanzlichem und bakteriellem Ausgangsmaterial fest, daß außer 2 - Desoxyribose keine andere 2-Desoxypentose im DNS-Molekül nachzuweisen ist. 2-Desoxyribose ist ein Poly-hydroxy-aldehyd, der als zyklisches Halbacetal vorliegt. Die HO-Gruppe der Halbacetal-Bindung ist besonders reaktionsfähig und kann mit Aminen unter Abgabe von Wasser Verbindungen eingehen, die als N-Glykoside bekannt sind. In dieser Weise liegt auch 2-Desoxyribose in den Nucleinsäuren vor. Sie ist durch die N-Glykosid-Bindung an eine Purin- oder Pyrimidinbase gebunden. Die entstehenden Verbindungen nennt man Nucleoside.

Die nachstfolgende Stufe bei der Biosynthese der Nucleinsäuren liefert die Nucleotide, bei denen noch Phosphorsäure in das Molekül eintritt, die esterartig an die Desoxyribose gebunden wird. Im Gesamtmolekül der DNS sind die Nucleotide durch die Phosphorsäure in Diesterbindung miteinander verknüpft. Damit ergibt sich, je nach der Größe des Moleküls, eine verschieden lange Folge von Nucleotiden.

Die Basen, die bis jetzt in den Desoxyribonucleinsäuren nachgewiesen wurden, sind die Purinbasen Adenin und Guanin und die Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin. (Dabei ist das Vorkommen von Thymin typisch für DNS, wogegen in der RNS an seiner Stelle hauptsächlich Uracil gefunden wurde).

Die Reindarstellung der verschiedenen Desoxyribonucleinsäuren ist mit den Methoden, die uns heute zur Verfügung stehen, nur teilweise zu lösen. Es ist möglich, Nucleinsäure-Fractionen darzustellen, die frei von Proteinen und anderen organischen Bestandteilen sind, und das Verhältnis ihrer Purin- und Pyrimidinbasen untereinander zu bestimmen. Die Basensequenz kann jedoch bis jetzt nur an niedermolekularen DNS-Molekülen nachgewiesen werden. Neuere Arbeiten von APOSHIAN, KORNBERG (1962), JOSSE u. a. (1961) zeigen Erfolge bei der Synthese von DNS. Es gelang ihnen, mit Hilfe von Polymerasen Nucleotide in das DNS-Molekül einzubauen, die durch $5' - p^{32}$ - gekennzeichnet waren. Damit war es möglich, bis zu sechzehn Basensequenzen zu ermitteln. Die Basensequenz ist charakteristisch für die einzelnen Desoxyribonucleinsäuren und ein entscheidendes Merkmal für ihre Differenzierung.

Wenn man unterstellt, daß ein DNS-Molekül aus einigen tausend Nucleotiden aufgebaut ist, so läßt sich die große Zahl an Möglichkeiten zur Bildung von Isomeren leicht denken; ein Gesichtspunkt, der besonders für die Funktion der DNS als Überträger der Erbfaktoren und als Übermittler von Informationen bei der Proteinsynthese von großer Bedeutung ist (MIRSKY, 1963).

Abbildung 1, Primärstruktur der DNS

b) Sekundärstruktur der DNS

Viele Versuche und Überlegungen von einigen Autoren über die Sekundärstruktur der DNS führten über Zwischenstufen verschiedener Strukturmodelle von FURBERG (1952), der unterschiedliche Drehungsebenen für die Purin- und Pyrimidinbasen angenommen hatte, über das einfache Spiralmodell von PAULING und COREY (1953), zu der Entwicklung des Strukturmodells von

WATSON und CRICK (1953), die damit viele der bisherigen Ergebnisse über die Relation der beiden Basen bestätigen konnten.

Demnach handelt es sich um zwei Ketten, die in spiraliger Anordnung um eine gemeinsame Achse stehen. Dabei liegen die Basen paarweise einander gegenüber und sind durch eine einfache Wasserstoffbrücke verbunden. Die Anordnung in der Gegenüberstellung der beiden Basen ist streng spezifisch und einer Purinbase kann nur eine Pyrimidinbase gegenüberstehen, wobei allerdings die Sequenz der Basen auf einer Kette der Doppelspirale bei den verschiedenen DN-Säuren unterschiedlich ist. Doch ergibt sich in der Folge, daß bei der zweiten Kette der Doppelspirale die Reihenfolge der Basen jeweils durch die erste Kette bestimmt wird (siehe oben), da einer Purinbase nur eine Pyrimidinbase gegenüberstehen kann.

Quantitative Untersuchungen von CHARGAFF (1951) und WYATT (1951) haben ergeben, daß bei den DN-Säuren der verschiedenen Gewebe sowohl das Verhältnis von Purin- zu Pyrimidinbasen, als auch das von Adenin zu Thymin und das von Cytosin zu Guanin immer gleich ist. Daraus ergab sich, daß bei den obengenannten Basen der DNS nur folgende Paare in Frage kommen können:

Adenin - Thymin

Guanin - Cytosin

Tabelle 4

Verteilung von Purin- und Pyrimidinbasen in DNSäuren
verschiedener Organe von vier verschiedenen Säugetieren
(CHARGAFF, LIPSHIZ, 1953)

ART	Organ	Zahl d. Proben	Adenin Mol %	Guanin Mol %	Cytosin Mol %	Thymin Mol %	Verh. v. Ad.u.Th. Gu.u.Cy.
Rind	Thymus	21	29.0	21.2	21.2	28.5	1.36
	Leber	2	28.8	21.0	21.1	29.0	1.37
Schaf	Thymus	2	29.3	21.4	21.0	28.3	1.36
	Leber	2	29.3	20.7	20.8	29.2	1.41
Schwein	Thymus	2	30.0	20.4	20.7	28.9	1.43
	Leber	2	29.4	20.5	20.5	29.7	1.44
	Milz	1	29.6	20.4	20.8	29.2	1.43
Mensch	Thymus	1	30.9	19.9	19.8	29.4	1.52
	Leber	4	30.3	19.5	19.9	30.3	1.54
Kalb	Thymus	-	27.6	22.6	19.9	28.3	(MIRSKY, 1962)

3. Vorkommen der DNS im Zellkern im Hinblick auf die Vererbung

Die Tatsache, daß einer gegebenen Polynucleotidkette zum Aufbau des ganzen Moleküls nur eine zweite Kette gegenüberstehen kann, deren Basensequenz durch die erste genau festgelegt wird, garantiert - bei gleichbleibenden Bedingungen - die Identität aller so aufgebauten Moleküle. Das ist wesentlich für die Tatsache, daß die Gene als Träger der Vererbung aus DNS-Molekülen aufgebaut sind, und für die Fähigkeit der identischen Reproduktion eine unbedingte Voraussetzung. DNS ist der Bestandteil in den Chromo-

somen, der Kontinuität und Individualität besitzt (MIRSKY, 1963). Ohne sie ist die Möglichkeit, immer wieder gleiche Neubildungen zu garantieren, nicht denkbar.

Diese Übereinstimmung wird auch deutlich durch Vorgänge, die durch die Einwirkung von Ultraviolett-Bestrahlung hervorgerufen wurden. Dabei stimmt das Wirkungsspektrum der UV-Bestrahlung mit dem Absorptionsspektrum der DNS überein. So haben Wellenlängen von 260 m μ die stärkste mutagene Wirkung und entsprechen damit jenen Wellenlängen, die auch von der DNS besonders stark absorbiert werden. Auf diese Weise künstlich erzeugte Mutationen werden auf Grund der identischen Reproduktion weitervererbt.

In ähnlicher Übereinstimmung befinden sich Gene bzw. Chromosomen und DNS im Hinblick auf die Konstanz der DNS-Konzentration in sämtlichen Zellen eines Individuums. Das ist dann zu erklären, wenn man Chromosomen gleichsetzt mit DNS, denn alle Körperzellen enthalten die gleiche Zahl Chromosomen und damit auch eine gleichbleibende Menge DNS. Dies geht auch aus Untersuchungen hervor, die VENDRELY (1948) über den DNS-Gehalt des Zellkerns gemacht hat. Daraus wird deutlich, daß der DNS-Gehalt von Zellkernen aus verschiedenen Geweben gleich groß ist, abgesehen von Differenzen, die durch die Versuchsbedingungen gegeben sind. Im Zellkern der Spermien findet sich jedoch nur die Hälfte der DNS-Menge, die in den Körperzellen gefunden wurde. Dies entspricht auch dem haploiden Chromosomensatz, der den Spermien als Folge der Reifeteilung zu Grunde liegt. (Siehe Tabelle 5 und 6)

Tabelle 5

Menge der DNS pro Kern in Rindergeweben (BOIVIN, 1948)

Organ	DNS Picogramm	Zahl der Kerntypen	Chromoso- mensatz
Thymus	6.6	1	diploid
Leber	6.4	2	diploid
Pankreas	6.9	6	diploid
Niere	5.9	10	diploid
Spermien	3.3	1	haploid

Tabelle 6

DNS-Gehalt in Kernen diploider Zellen und von Spermien
verschiedener Arten (MIRSKY, 1949) in $\text{mg} \times 10^{-6}$

Art	Erythrozyten	Leber	Spermien
Huhn	2,34	2,39	1,26
Alse	1,97	2,01	0,91
Karpfen	3,49	3,33	1,64
Forelle	5,79	-, --	-, --
Kröte	7,33	-, --	-, --

4. Molekulargewicht der DNS

Bestimmungen des Molekulargewichts mit Hilfe der Sedimentationsgeschwindigkeit in der Ultrazentrifuge wurden erschwert durch die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Festlegung des Sedimentationskoeffizienten, der von der jeweiligen Konzentration abhängig war. In gleicher Weise ergaben sich widersprechende Ergebnisse bei der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten, der sich ebenfalls mit der Konzentration ändert. So beobachtete KAHLER (1948) eine Erhöhung des Diffusionskoeffizienten, während CECIL und OGSTON (1948) eine Erniedrigung feststellten. Durch Kombination der Ergebnisse für Sedimentation und Diffusion resultierte ein Molekulargewicht von $1,3$ bis $1,5 \times 10^6$ für verschiedene Präparate von Kalbsthymus-DNS.

Auf andere Weise gingen DOTY und EUNCE (1952) vor, die wesentlich höhere Molekulargewichte durch Lichtstreuung bestimmten. Dabei ergaben sich Molekulargewichte von $4,4 \times 10^6$ bis zu $8,0 \times 10^6$.

5. Abhängigkeit der physikalischen Eigenschaften der DNS von Ionen-Konzentration und Temperatur

Bei der Messung der Viskosität und der Strömungsdoppelbrechung von Natrium-DNS in Lösung, ohne Zusatz von Elektrolyten, waren die Ergebnisse nicht mehr reproduzierbar. Das war auf eine langsame Abnahme des Polymerisationsgrades in reinen, wässrigen Lösungen zurückzuführen, die durch eine Erhöhung der Temperatur ebenfalls verstärkt wurde. Bei Anwesenheit eines Elektrolyten dagegen wurde die Abnahme des Polymerisationsgrades verzögert. Dazu kam noch, daß sich die Eigenschaft des jeweils verwendeten DNS-Präparates bei verschiedenen Versuchen mit der Methode änderte, mit der es gewonnen worden war.

Abnahme der Viskosität: Von verschiedenen Autoren wurde eine Abnahme der Viskosität der Natrium-DNS festgestellt, sobald ein Elektrolyt beigelegt wurde. Dabei handelte es sich nicht, wie von GREENSTEIN und JENRETTE (1940) zuerst interpretiert wurde, um eine Erniedrigung des Polymerisationsgrades, sondern um einen reversiblen Prozeß. Es findet dabei auch keine Freisetzung von sauren oder alkalischen Gruppen statt, was bedeutet, daß keine Trennung der Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Basen stattfindet. Infolgedessen liegt auch keine Veränderung des Molekulargewichtes vor, wenn die Ionenkonzentration erhöht wird.

JORDAN (1954) vermutete, daß die Viskositätsabnahme dadurch zustande kommt, daß nach Hinzufügen eines Elektrolyten durch Neutralisation einer geladenen Gruppe eine Kontraktion des DNS-Moleküls hervorgerufen wird. Er zog dabei Vergleiche mit dem ähnlichen Verhalten von synthetischen Polyelektrolyten.

POUJET (1952) stellte auf Grund von eigenen Viskositätsmessungen mit DNS-Lösungen in einem Couette-Viskosimeter fest, daß bei sehr starken Verdünnungen der DNS die Ionenkonzentration ohne Einfluß auf die Viskosität bleibt. Gleicher Meinung waren CONWAY und BUTLER (1954), die darin konform gingen, daß das DNS-Molekül keine Kontraktion zeigt, wie JORDAN (1954) bei Zusatz eines Elektrolyten angenommen hatte. Es kommt lediglich zu einer Veränderung des elektrostatischen Spannungsverhältnisses zwischen den einzelnen DNS-Molekülen, das durch die Erhöhung der Ionenzahl herabgesetzt wird. Dies wirkt sich dann in einer Veränderung des bisherigen Gleichgewichts aus.

Versuche von THOMAS (1954), wie auch von SHACK u.a. (1953) zeigen, daß die UV-Absorption durch die Zugabe von Molekyltrypsin an einer Natrium-DNA-Lösung geringfügig ansteigt. Sie schlossen daraus, daß das DNS-Molekül geringen Veränderungen fähig ist. Jedoch nach Zugabe von Elektrolyten keine Kontraktion erfolgt. Das kommt einer Verlängerung oder Verdünnung des Moleküls oder einer Änderung des Watson-Crick-Modells (siehe Seite 18) bedingt durch Veränderung der Wasserstoffbindungen einerseits und der abratenden Wirkung elektrisch geladenen Gruppen andererseits. Eine Veränderung der elektrostatischen Spannung zwischen den einzelnen Phosphatgruppen scheint nicht möglich. Das UV-Absorptionsspektrum, solange die Wasserstoffbindungen zwischen den beiden Ketten erhalten bleiben, (LALAND, 1954)

Dabei sind Vergleiche dieser Ergebnisse mit Form und Molekulargewicht mehr oder weniger aufschlußreich. Die Struktur nach WATSON und CRICK (1953) ergibt ein gewisses Spannungsverhältnis im Hinblick auf die Wasserstoffbindungen und die Van der Waal'schen Kräfte zwischen den Purin- und Pyrimidin-Ringsystemen der beiden DNS-Spiralen und damit ein verhältnismäßig steifes Molekül.

So führt die Erhöhung der Konzentration der Natrium-Ionen, die durch eine paarweise Formation der Ionen einige der geladenen Gruppen neutralisieren, zu einer Störung des Gleichgewichts. Die Folge ist eine teilweise Verkürzung des Moleküls.

C. Desoxyribonuclease

1. Charakterisierung der Desoxyribonuclease

Es sind verschiedene Enzyme bekannt, die hochmolekulare Desoxyribonucleinsäuren angreifen. So beobachtete schon ARAKI (1903), daß verschiedene Gewebeextrakte imstande waren, DNS abzubauen. FFULLEN (1924) erweiterte diese Ergebnisse, indem er feststellte, daß die abratende Wirkung dieser Stoffe nur bis zu dem Stadium der Oligonucleotide, nicht aber bis zu

den Mononucleotiden verlief. LEVENE (1938) erkannte in dem Abbau der DNS bis zu den Oligonucleotiden durch Pankreas-DNase eine wesentliche Voraussetzung für den weiteren Abbau der Oligonucleotide zu Mononucleotiden durch die Phosphatase der Darmschleimhaut. Im menschlichen Samenplasma konnte ZAMENHOF (1950) ein Enzym nachweisen, das fähig war, Desoxypentosenucleinsäure zu depolymerisieren.

a) Pankreas-Desoxyribonuclease (DNase I)

Schon 1943 erforschten FISCHER und LEHMANN-ECHTERNACHT, LASKOWSKY und SEIDEL (1946) und McCARTY (1946) die Reaktion von teilweise gereinigter Pankreas-DNase. FISCHER, McCARTY, wie auch LASKOWSKY und SEIDEL (1946), entdeckten die Bedeutung von Magnesium-Ionen und Mangan-Ionen (McCARTY, 1946) als Aktivatoren für das Enzym.

Genauere Resultate ergaben die Untersuchungen von KUNITZ (1950) mit Pankreas-DNase, die er als erster in kristalliner Form gewonnen hatte. Er untersuchte dabei in erster Linie ihre katalytische Wirkung auf ihr spezifisches Substrat, die Desoxyribonucleinsäure. In gleicher Weise wie die oben genannten Autoren bestätigte KUNITZ (1950) die Wirkung von Magnesium-Ionen als Aktivatoren der DNase. Er stellte fest, daß bei seinen Versuchen die optimale $MgSO_4$ -Konzentration zwischen 0,01 bis 0,02 m lag. Entsprechende Ergebnisse fanden LASKOWSKY und SEIDEL (s.o.). Aus diesen Arbeiten geht hervor, daß die zur Aktivierung erforderliche $MgSO_4$ -Konzentration weit mehr von der jeweiligen Desoxyribonucleinsäure-Konzentration abhängt als von der Menge des verwendeten Enzyms.

Durch diese Relation schien die Konzentration von Magnesium-Ionen für eine optimale Aktivität der DNase in sehr engem Zusammenhang damit zu stehen, inwieweit die Phosphodiester-Gruppe der DNS mit Magnesium-Ionen gesättigt war. Dieselbe Abhängigkeit ergab sich bei der Verwendung von Mangan. Calcium, das allein nur sehr schwach aktivierend auf die DNase wirkt, steigert wiederum in Kombination mit Magnesium dessen Wirksamkeit um das dreifache und bewirkt damit nahezu eine Aktivierung der DNase, die sonst nur mit Mangan erreicht wurde.

WIBERG (1958) untersuchte auch die hemmende Wirkung von Natrium-Zitrat bei seinen Versuchen über die Magnesium- und Mangandependenz der Pankreas-DNase. Er fand dabei, daß Natrium-Zitrat ein schwacher Inhibitor auf die Magnesium-Wirkung auftritt, bei Verwendung von Mangan jedoch ohne meßbaren Einfluß ist.

b) Thymus-Desoxyribonuclease (DNase II)

MAVER und GRECO (1949), wie auch BROWN, JACOBS und LASKOWSKY (1952) erkannten, daß die DNase-Aktivität, die bei Inkubation von Thymusgewebe mit DNS in Erscheinung tritt, weitgehend auf ein Enzym zurückzuführen ist, das sich von Pankreas-DNase (DNase I) unterscheidet.

LASKOWSKY und Mitarbeiter (1954), wie auch WEBB (1952) gelang es, eine extraktionsfähige Fraktion dieser Thymus-DNase in gereinigter Form zu erhalten. Dieses Enzym wurde durch 0,020 m $MgSO_4$ gehemmt, und es fand, im Gegensatz zu Pankreas-DNase, bei einer Konzentration von 0,005 m Mg-Sulfat, keine Aktivierung statt. Das zeigte, zusammen mit den Ergebnissen von KUNITZ (1950), daß die DNase verschiedener Säugetierorgane in zwei Formen vorliegt:

- 1.) eine dem kristallinen Pankreas-Ferment entsprechende DNase mit einem pH-Optimum von 6,0 bis 7,0
- 2.) eine bei pH 5,0 optimal aktive, nicht von Magnesium abhängige DNase, die zuerst aus Thymusgewebe gewonnen worden war.

In Übereinstimmung mit ALLFREY und MIRSKY (1952), scheint DNase I ein spezifisches Enzym zur Verdauung aus dem Pankreas-Sekret zu sein und wurde auch in keinem anderen Gewebe in nennenswerten Konzentrationen gefunden. DNase II mit saurem pH-Optimum wurde in vielen Geweben, und dabei hauptsächlich im Cytoplasma, gefunden.

Systematisch gehören Pankreas-DNase und Thymus-DNase zu den Hydrolasen, zu der Gruppe der Phosphodiesterasen. Viele der sonst noch bekannten Enzyme im Bereich der Hydrolasen bauen nur die Stufe der Mononucleotide wei-

ter ab, so daß als spezifische Enzyme der Nucleinsäuren nur solche in Frage kommen können, die an den Phosphodiesterbindungen der hochmolekularen DNS angreifen, und damit die Nucleinsäuren hydrolytisch in Oligonucleotide spalten.

2. Vorkommen der Desoxyribonuclease

Die Lokalisierung der DNase innerhalb der Zelle ist noch nicht eindeutig geklärt und die Ansichten darüber, ob das Enzym im Zellkern, in den Mitochondrien oder hauptsächlich im Cytoplasma gelagert ist, gehen noch auseinander.

So fanden LANG u. a. (1950) eine hohe Aktivität von DNase im Zellkern bei einem Wirkungsoptimum von pH 5,0. LASKOWSKY u. a. (1954) stellten DNase in allen Teilen von Thymuszellen fest. Es ist auch durchaus möglich, daß ein Substrat-Enzym-Komplex besteht, wie es ja bei den meisten Enzymen der Fall ist. Dies läßt auch die Frage nach intra- und extrazellulären Regulationsmechanismen entstehen, die den notwendigen Bestand an hochmolekularer DNS zu garantieren hätten. So zeigt z. B. ein Extrakt aus Hefe mit Kochsalzlösung beim Aufbewahren im Kühlschrank über einige Monate eine bis auf das 50fache zunehmende DNase-Aktivität. Wässrige Extrakte aus gemahlenen Hefezellen liefern einen DNase-Hemmstoff, der nur die Hefe-DNase zu hemmen vermag, nicht jedoch das entsprechende Enzym aus *Neurospora crassa*, keimender Gerste, Kalbsthymus oder Pankreas. Der Hemmstoff ist hitzelabil und wird durch kristallines Trypsin und durch eine Hefeprotease inaktiviert. Er verliert seine Wirkung beim Aufbewahren über zwanzig Stunden bei 40°C und über zwei bis vier Wochen bei 4°C. Bei 84 %iger Sättigung der wässrigen Lösung mit Ammonium-Sulfat fällt er aus (ZAHMENHOF und CHARGAFF, 1949).

3. Wirkung der Desoxyribonuclease auf DNS

a) Allgemeines

Bis zur Einführung der DNS-Bestimmungen durch COHN und VOLKEN (1953) wurde die Meinung vertreten, daß die DNS durch DNase bis zu Tetra-Nucleotiden abgebaut wurde. Daraus rückwirkend wurde die Folgerung gezogen, daß die DNS-Moleküle Polymere darstellen, die aus Tetra-Nucleotiden aufgebaut wären. Heute wird allerdings auf Grund der genaueren Kenntnis des DNS-Moleküls allgemein angenommen, daß der Abbau der DNS durch DNase sowohl Dinucleotide und Tetranucleotide, als auch Oligonucleotide von verschiedenen Polymerisationsgraden ergibt.

Denkt man bei den DNSäuren an die vielen Möglichkeiten der Gruppierung und Aneinanderlagerung der einzelnen Basen innerhalb des Gesamtmoleküls, so sind natürlicherweise auch ebenso viele Möglichkeiten denkbar, diese Bindungen abzubauen. Hier besteht allerdings noch sehr wenig Klarheit, doch könnte man die Funktion der DNase, die sie bei der enzymatischen Spaltung der DNS innehat, soweit definieren, daß die Spaltprodukte der DNS, die Oligonucleotide, von unterschiedlicher Größe und Wirkungsspezifität, wiederum bestimmte Funktionen innerhalb der lebenden Zelle besitzen.

Ob es sich dabei allerdings um einen fortlaufenden Abbau handelt, oder ob dieser Vorgang in vivo stufenweise vor sich geht und auf einer gegenseitigen Wechselwirkung beruht, ist noch nicht geklärt.

Testreihen, in denen verschiedene Substrate auf ihr Verhalten gegenüber DNase geprüft wurden, ergaben für dieses Enzym als Phosphodiesterase eine weit höhere Substratspezifität als z.B. für Ribonuclease. Nach TAMM, SAPHIRO und CHARGAFF (1952) zeigt jedoch der Polymerisationsgrad der DNS keinen wesentlichen Einfluß auf die Aktivität der DNase, deren Wirkungsgrad in vivo wohl ohnehin durch die Konzentration an DNS und die entstandenen Spaltprodukte dirigiert, d.h. gehemmt und aktiviert wird.

Um die Zahl der von der DNase gespaltenen Phosphorsäureesterbindungen und die Natur der dabei beteiligten Bindungen festzustellen, wurden von

CAVALIERI und HATSCH (1953) die freigesetzten Wasserstoff-Ionen kolorimetrisch in p-Nitrophenol-Phenolpuffer gemessen. Die Ergebnisse zeigen, daß bei der Spaltung kompetitive und nichtkompetitive Hemmwirkungen durch das Substrat vorkommen, die an verschiedenen Stellen des Enzyms angreifen, über deren relatives Ausmaß sich aber noch nichts aussagen läßt. Auch in den Versuchen von KUNITZ (1950) zeigte sich eine Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der DNS-Spaltung von der Substratkonzentration.

b) Änderung des optischen Verhaltens der DNS durch Einwirkung von Desoxyribonuclease

Die Einwirkung von DNase auf Thymus-DNS ist nach den Angaben von KUNITZ (1950) mit einem Ansteigen der Ultraviolett-Absorption bei 260 μ von maximal 30 % verbunden. Bei sonst gleichen Bedingungen ist der anfängliche Anstieg der optischen Dichte in der Minute dem Gehalt an zugeführter DNase proportional. Ein ähnliches optisches Verhalten beobachtete auch KURNICK (1953) bei der Depolymerisation von DNS durch Erhitzen in Abwesenheit des Enzyms.

c) Viskositätsänderungen der DNS durch Einwirkung von Desoxyribonuclease

Die Inkubation der DNS mit Desoxyribonuclease bedingt durch die einsetzende Hydrolyse einen ziemlich raschen Abfall der Viskosität. Hier sind besonders die Anfangswerte des Viskositätsabfalls unmittelbar nach der Inkubation charakteristisch, da eine Veränderung der Viskosität schon bei einer Spaltung des DNS-Moleküls in noch verhältnismäßig große Bruchstücke am Anfang der Reaktion sehr deutlich in Erscheinung tritt. Dieser Viskositätsabfall ist ebenfalls, wie bei Veränderung der optischen Dichte, der Menge der zugesetzten DNase proportional. (Siehe auch Seite 23)

III. METHODIK

A. Herkunft des Untersuchungsmaterials

Die Ejakulatproben, die zur Untersuchung verwendet worden waren, stammten von Tieren aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München und der Bullenprüfstation Aubing¹⁾. Alle Organproben waren vom Schlachthof der Stadt München. Das Alter der Tiere, von denen die Proben stammten, lag zwischen eins und fünf Jahren.

Zur Untersuchung und zu Vergleichszwecken wurden Nebenhodenschwanz (Cauda epididymidis), Samenleiterampulle (Ampulla ductus deferentis), Vesikulardrüsen (Glandulae vesikulares), Prostata, Bulbourethraldrüsen (Glandulae bulbourethrales) und Ejakulat verwendet. Da das Rind - im Gegensatz zu einigen anderen Säugetieren - im Verlauf des Ductus deferens eine ampullenartige Erweiterung aufweist, wurde dieser besondere Beachtung geschenkt.

B. Gewinnung der Proben

Die betreffenden Organe wurden unmittelbar nach der Schlachtung der Bullen entfernt. Im allgemeinen wurden die Eingeweide von den Schlächtern so herausgeschnitten, daß die Geschlechtsorgane, zusammen mit der Harnblase, noch in Verbindung mit dem Enddarm waren. Der Samenleiter (Ductus deferens) mit der Ampulle und die Vesikulardrüsen wurden nun von der Harnblase, dem Enddarm und dem umgebenden Fett getrennt und anschließend für die Feinpräparation ins Labor gebracht.

¹⁾ Herrn Prof. Dr. Bajer und Herrn Prof. Dr. Leidl von der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München, sowie Herrn Dr. Haeger von der Bullenprüfstation Aubing und der Leitung des Schlachthofes der Stadt München sei an dieser Stelle für die Überlassung des Untersuchungsmaterials gedankt.

1. Sekrete

Nebenhoden (direkte Entnahme). Um einen genaueren Wert für die Spermienkonzentration und, soweit möglich, reinen Inhalt aus dem Nebenhodenschwanz zu bekommen, wurde das Sekret folgendermaßen entnommen:

Die bindegewebige Kapsel des Nebenhodens wurde abpräpariert, und die Schlingen des Nebenhodenkanals durch einen Scherenschlag geöffnet. Die austretende Suspension von Sekret und Spermien wurde nun mit einer Pipette aufgenommen und in ein Zentrifugenglas gebracht. Anschließend wurde bei 16 000 U/Min. und 0° C zentrifugiert und der spermienfreie Überstand untersucht.

Dabei wurden im allgemeinen nur solche Exemplare verwendet, die schon mit bloßem Auge makroskopisch sichtbar in den Ductus deferens nahen Abschnitten eine starke Füllung mit Spermien zeigten, um dadurch von vornherein eine möglichst hohe Sekret- und Spermienkonzentration zu erzielen.

Samenleiterampullen. Die Präparation der beiden Ampullen erfolgte in der Weise, daß vom freien, hodenseitigen Ende des abgeschnittenen Ductus deferens bis zur Basis an der Einmündung in die Urethra im Bereich des Musculus bulbourethralis jede Ampulle vom umgebenden Gewebe freipräpariert wurde. Es war nun darauf zu achten, daß die Außenseite der Ampulle frei von Serum oder Blutresten war, um das Sekret rein zu erhalten und Fehlbestimmungen im Proteingehalt und in der DNase-Aktivität zu vermeiden. Jede der beiden Ampullen wurde nun kurz vor der Einmündung in die Urethra abgeschnitten und vorsichtig in ein Becherglas ausgedrückt. Dabei war die Menge des Ampulleninhalts bei den verschiedenen Bullen sehr unterschiedlich; es ist zu bedenken, daß die einen oder anderen Tiere im Viehhof oft schon ein bis zwei Tage vor der Schlachtung beieinanderstanden und in dieser Zeit - oft noch unmittelbar vor dem Schlachten - möglicherweise abgesamt hatten. Das so erhaltene Sekret blieb unverdünnt, und wurde nun, wie oben beschrieben (siehe Seite 31), entweder bei 16 000 U/Min. zur Gewinnung des spermienfreien Sekretes, oder bei 1 500 bis 2 000 U/Min. zur Untersuchung von gewaschenen oder zerschlagenen Spermien zentrifugiert.

Vesikulardrüsen In weitere Probe wurde das Sekret der Vesikulardrüsen untersucht. Die Vesikulardrüsen, die auf gleicher Höhe zusammen mit den Samenleiterampullen in die Urethra münden, wurden ebenfalls wie die Ampullen von dem umliegenden Gewebe freipräpariert, um Verunreinigungen durch Gewebsflüssigkeit möglichst zu vermeiden. Vor ihrer Einmündung in die Urethra wurden sie abgeschnitten, gereinigt und nun das austretende Sekret aufgefangen, 1 : 10 mit Aqua dest. verdünnt und untersucht.

Ejakulat Das für die Untersuchung der Vergleichswerte benützte Ejakulat stammte ausschließlich von Bullen der Bullenprüfstation München - Aubing. Die Bullen entsprachen im Alter etwa den Schlachttieren, von denen die übrigen Organe stammten, und lag zwischen zwei und fünf Jahren. Die Proben der einzelnen Bullen wurden nach Ermittlung der Spermienzahl getrennt zentrifugiert und der Überstand 1 : 10 mit Aqua dest. verdünnt und untersucht.

2. Homogenate

Von dem Gewebe der Nebenhoden, der Ampullendrüsen, der Vesikulardrüsen, von Prostata und Bulbourethraldrüsen wurden Homogenate hergestellt, um damit Vergleichswerte für die Sekrete zu bekommen.

Nebenhoden Da das Nebenhodengewebe sehr stark mit straffem Bindegewebe durchsetzt ist, wurden die Nebenhoden zur Prüfung des Homogenates nicht mit dem Homogenisator, sondern mit der Schere möglichst gut zerkleinert und in physiologische Kochsalzlösung gebracht. Diese Aufschwemmung von Spermien und Nebenhodengewebe blieb noch etwa fünf bis zehn Minuten stehen. Nach dieser Zeit wurde alles durch ein Glasfilter in ein Becherglas abgegossen. Auf diese Weise erhielt man eine Suspension von Spermien und Gewebe. Die so erhaltene Testflüssigkeit wurde zu einem Teil belassen, das Übrige wurde entweder bei 16 000 U/Min. und 0° C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert, um einen spermienfreien Überstand zu erhalten, oder bei 1 500 bis 2 000 U/Min., um nach Abgießen des Überstandes

- a) gewaschene oder
- b) zerschlagene Spermien

auf ihre Desoxyribonuclease-Aktivität zu untersuchen. (Siehe Seite 31)

Samenleiterampulle Die abgeschnittenen Samenleiterampullen (ca. 10 Stück) wurden der Länge nach aufgeschnitten und flach auseinander gespreizt. Nach Entfernung der Spermien und des locker anhaftenden Sekretes durch Abspülen mit Aqua dest. wurde das Drüsengewebe mit Skalpellschere und Pinzette abpräpariert und in einen Homogenisator gebracht; dazu kamen etwa 10 ml physiologische Kochsalzlösung. Anschließend wurde 30 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 Minuten bei 3 500 U/Min. zentrifugiert, und der Überstand untersucht.

Vesikulardrüsen, Prostata, Bulbourethraldrüsen In gleicher Weise wurde mit dem Gewebe der Vesikulardrüsen, Prostata und Bulbourethraldrüsen verfahren. Als Produkt erhielt man in allen Fällen eine Suspension von undurchsichtig bräunlicher Beschaffenheit, die dann ohne weitere Verdünnung zur Untersuchung verwendet wurde.

3. Spermien

Spermien aus Nebenhoden, Ampullen und Ejakulat wurden aus den oben beschriebenen Proben durch Zentrifugieren bei 2 000 U/Min. vom übrigen Sekret getrennt und drei Mal nacheinander mit jeweils 20 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Um sie für das Viskosimeter durchgängig zu machen, wurden sie auf eine Dichte von ca. 5×10^8 Spermien/ml eingestellt. Ein Teil der Spermien, mit einer Dichte von 1.8×10^9 Sperm./ml wurde in dem Zellhomogenisator nach MERKENSCHLAGER, SCHLOSSMANN und KURZ (1957) mit dem gleichen Gewicht an Glasperlen, Durchmesser 0,45 - 0,50 mm, zerschlagen. Das erhaltene Material wurde bei 16 000 U/Min. zentrifugiert, und der Überstand für die Untersuchung verwendet.

Die Spermienzahl wurde durch direkte Zählung in der Thoma - Zeiss - Zählkammer ermittelt. Die Proben wurden dabei 1 : 100 mit Hayem'scher Lösung verdünnt.

C. Gewinnung der Desoxyribonucleinsäure

Für die Untersuchungen stand als spezifisches Substrat der Desoxyribonuclease das Natriumsalz der Desoxyribonucleinsäure zur Verfügung. Für ihre Gewinnung werden verschiedene Methoden angewandt, die alle auf Kalbsthymus als Ausgangsmaterial zurückgehen. Im vorliegenden Fall erfolgte die Isolierung der DNS aus Kalbsthymus nach der Methode von KAY, SIMONS und DOUNCE (1952), die im folgenden beschrieben sei.

Thymus eines frisch geschlachteten Kalbes wurde sofort nach der Entnahme in einen Thermosbehälter mit Trockeneis gebracht. Dem Prozess des Einfrierens ist insoweit Beachtung zu schenken, da nicht eingefrorenes Material nach den Erfahrungen der oben genannten Autoren nur unbefriedigende Ergebnisse zur Folge hat. Von diesem Ausgangsmaterial wurden nun 50 g klein geschnitten und in einem "Waring Blender" in einer Lösung von 20 ml eisgekühlter 0,01 m Natriumzitratlösung mit einem Gehalt von 0,2% NaCl homogenisiert. Dabei ist ein längeres Homogenisieren zu vermeiden. Auch CHARGAFF empfiehlt, den Homogenisierungsprozeß möglichst zu reduzieren, und hält 60 sec. für ausreichend. Damit soll durch schonende mechanische Bearbeitung ein möglichst hoher Polymersationsgrad erhalten bleiben. Das Homogenat wurde 30 Min. bei 0° C und 2.500 U/Min. zentrifugiert, und das Sediment drei weitere Male in der oben erwähnten NaCl-Zitratlösung aufgeschwemmt und jeweils unter den gleichen Bedingungen homogenisiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment 3 Minuten im "Waring Blender" mit 1 l eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert. Dieser Suspension wurde nun in einem genügend großen Becherglas unter ständigem Rühren 90 ml einer Natrium-Dodecylsulfatlösung beigelegt. Diese Lösung wurde aus 5 g Natriumdodecylsulfat hergestellt, an Stelle von gereinigtem Duponol, dem 100 ml 45%iges Aethanol zugesetzt wurde. Das dabei entstandene Gel wurde drei Stunden kräftig bei Zimmertemperatur gerührt, wobei es allmählich in eine sehr viskose Lösung überging. Um die NaCl-Konzentration auf 1 m zu bringen, wurden 55 g Natriumchlorid zugesetzt und weitere 10 Min. gerührt. Das erhaltene Produkt wurde in der Kühlzentrifuge bei 0° C und 15.000 U/Min. zentrifugiert. (Bei niedriger Geschwindigkeit entsprechend länger). Aus dem Überstehenden wurde durch Hinzufügen des gleichen Volumens von 95%igem Aethanol die rohe Natrium-DNS ausgefällt, die sich als faserige Masse um den Rührer gewickelt hatte. Diese faserige Masse wurde nun zwischen Filterpapier ausgepreßt und zuerst drei Mal mit 95%igem Aethanol und anschließend solange

mit Aceton gewaschen, bis die Waschflüssigkeit keine Trübung mehr zeigte. Dieses Material wurde anschließend an der Luft getrocknet. Bei einer Ausgangsmenge von 50 g Thymus betrug - nach eigenem Ergebnis - das Gewicht des gewonnenen Produktes 2,42 g.

Dieses rohe Produkt wurde nun durch kräftiges Rühren bei Zimmertemperatur in 700 ml Aqua dest. gelöst. Darauf wurden 63 ml der Natrium-Dodecylsulfatlösung zugesetzt und 60 Min. gerührt. Durch Hinzufügen von 45 g NaCl wurde die Lösung wieder auf 1 m NaCl gebracht, 60 Min. bei 13 000 U/Min. zentrifugiert und aus dem Überstand die Natrium-DNS, wie oben beschrieben, mit Aethanol gefällt und anschließend gewaschen. Danach wurde noch einmal das gewaschene und getrocknete Produkt in 700 ml Aqua dest. gelöst, durch Hinzufügen von 35 g Natriumchlorid auf 0,14 m NaCl gebracht und bei 13 000 U/Min. 1 Stunde zentrifugiert. Unter weiterem Rühren wurde dem Überstand langsam die gleiche Menge 95 %iges Aethanol zugefügt, wodurch die Natrium-DNS ausgefällt wurde. Das so erhaltene faserige Produkt wurde wie oben in Aethanol und Aceton gewaschen, bis die Spülflüssigkeit klar war. Die Menge des Endprodukts betrug im vorliegenden Falle 1,94 g.

Die so gewonnene Desoxyribonucleinsäure wurde in einem gut verschlossenen Glasgefäß bei Zimmertemperatur trocken aufbewahrt, und nur jeweils die benötigte Menge für die einzelnen Versuche in Aqua dest. Konzentration 1 mg/ml - gelöst.

D. Auswahl der Bestimmungsmethode

Soweit Versuche zur Charakterisierung reiner kristalliner Pankreas - Desoxyribonuclease (KUNITZ, 1950) oder zur Bestimmung der Desoxyribonuclease-Aktivität in tierischen oder pflanzlichen Sekreten gemacht worden sind, wurden sie mit Desoxyribonucleinsäure, dem für die DNase spezifischen Substrat, durchgeführt.

Dabei wurden bestimmte Veränderungen, die sich nach Einwirkung von DNase oder DNase-haltigem Material auf die physikalischen oder chemischen Eigenschaften der DNS ergaben, mit entsprechenden Methoden bestimmt.

Für die vorliegende Arbeit kamen insbesondere zwei verschiedene Bestimmungsmethoden zur Untersuchung der DNase-Aktivität in Betracht.

- 1.) die colorimetrische Methode mit Diphenylamin nach DISCHE, (1930) und
- 2.) die viskosimetrische Methode, modifiziert nach FEINSTEIN, (1960).

Bei der colorimetrischen Methode wurde in verschiedenen Proben 1,0 ml DNS (1 mg/ml) und 1,0 ml des dabei verwendeten Puffers gemischt und 5 Min. in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C gebracht. Nach dieser Zeit wurde die Mischung mit 1,0 ml der Enzymlösung inkubiert und im Wasserbad belassen. Nach verschiedenen Zeiten wurde die Reaktion der einzelnen Proben durch Zugabe von 1,0 ml 3 M Trichloroessigsäure (TCE) unterbrochen, wobei die noch nicht abgebaute DNS ausgefällt wurde. Darauf wurde 30 Min. im Eisbad gekühlt und anschließend zentrifugiert.

Vom Überstehenden wurden 1,5 ml mit 3,0 ml Diphenylaminreagenz (100 ml Eisessig + 1,0 g Diphenylamin + 2,75 ml konz. H_2SO_4) versetzt, 10 Min. bei 95°C erhitzt und sofort gekühlt.

Nun wurde ein Photometer Eppendorf mit Küvetten von 1 cm Schichttiefe und einem Filter Hg 578 die Extinktion gemessen, die für die Menge der aufgetretenen Spaltprodukte charakteristisch ist. Die Ergebnisse waren auf eine DNS-Standardkurve bezogen.

Zur Herstellung der Eichkurve wurden 1,5 ml der zu untersuchenden Lösung (zwischen 50 und 500 Gamma DNS) und 3 ml Diphenylaminreagenz gemischt und wie oben 10 Min. erhitzt, abgekühlt, und die Extinktion gemessen. Die Extinktionswerte wurden dann graphisch aufgetragen.

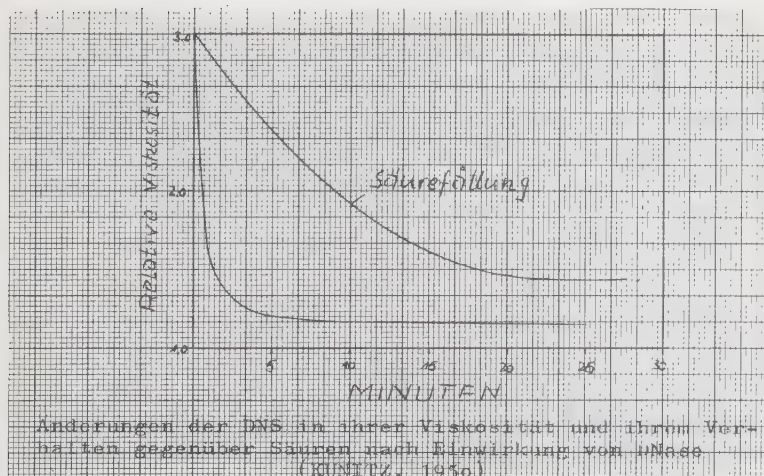
Nach anfänglichen Versuchen wurde diese Methode jedoch aufgegeben, da es bei den langen Inkubationszeiten nicht möglich war, einheitliche Vergleichswerte zu erhalten.

Die viskosimetrische Methode geht von den Veränderungen aus, die sich bei dem Abbau der DNS durch die DNase in ihrer Viskosität ergeben. Bei dieser Methode wurden unmittelbar nach Zugabe der Enzymlösung zu

der DNS-Substratlösung in kurzen Zeitabständen Viskositätsänderungen der DNS gemessen. Die Bestimmung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 21°C mit einem Kapillar-Viskosimeter nach Ostwald. Die Zeit, in der unter bestimmten Bedingungen die Viskosität auf die Hälfte reduziert wurde, ist dabei proportional der Enzymaktivität.

Im Gegensatz zu der colorimetrischen Methode, die zum Teil sehr lange Inkubationszeiten erfordert, - und dadurch eher die Möglichkeit in sich trägt, durch parallellaufende und unkontrollierbare Reaktionen unterschiedliche Ergebnisse zu liefern, - benötigt die viskosimetrische Methode nur kurze Inkubationszeiten. Das ist darin begründet, daß der Abfall der Viskosität, der durch Zugabe von DNase hervorgerufen wird, am Anfang der Reaktion, unmittelbar nach der Inkubation der DNS mit DNase-haltigem Sekret, am größten ist.

Abbildung 2



Gleichzeitig fällt auch eine mögliche Hemmung der Reaktion durch das Substrat und die entstehenden Spaltprodukte bei kurzer Inkubationszeit weitgehend weg, und Fehlresultate werden vermieden, die sich bei längerer Inkubationsdauer mit Sekreten von unterschiedlicher Zusammensetzung ergeben würden.

Dieser Punkt schien uns wesentlich bei der Auswahl der DNase-Bestimmungsmethode unter Verwendung von Enzymlösungen aus verschiedenen Geweben. Da es sich bei den Versuchen um wechselnde DNase-Mengen handelte, war es notwendig, eine Methode anzuwenden, die besonders in der Anfangsphase der Reaktion meßbare Unterschiede ergab.

E. Beschreibung der Methode zur viskosimetrischen Bestimmung von Desoxyribonuclease

1. Prinzip

Die Viskositätsmessungen wurden mit einem Viskosimeter nach Ostwald durchgeführt^{†)}, das für Relativ- und Vergleichsmessungen am geeignetsten ist. Dabei handelt es sich um ein Kapillar-Viskosimeter, dessen Meßprinzip auf dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz²⁾ beruht:

$$V = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot p}{8 \eta \cdot l} \cdot t$$

p = hydrostatischer Druck

η = Viskosität der Lösung

r = Radius der Kapillare

^{†)} Herrn Priv. Doz. Dr. U. Hagen vom Radiologischen Institut der Universität Freiburg bin ich für die methodischen Hinweise sehr zu Dank verpflichtet.

Der hydrostatische Druck p ist dabei von der Dichte ρ der Lösung abhängig. Somit sind alle anderen Größen bis auf die Durchlaufzeit t bekannt, so daß man die Gleichung folgendermaßen vereinfachen kann:

$$\eta = K \cdot \rho \cdot t$$

Nun läßt sich die Gerätekonstante K mit einer Flüssigkeit, deren Viskosität bekannt ist, bestimmen. Bei Relativmessungen vereinfacht sich die Anwendung noch weiter, man dividiert die Viskosität η der Lösung durch die Viskosität des reinen Lösungsmittels, und erhält damit die relative Viskosität η_r . Doch kann man auch die durch den gelösten Stoff in dem Lösungsmittel hervorgerufene Viskositäts-erhöhung ($\eta - \eta_L$) durch die Viskosität des reinen Lösungsmittels dividieren. Dies ist dann die spezifische Viskosität η_{sp} :

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_L}{\eta_L} = \eta_r - 1$$

Bei der Verwendung eines Kapillarviskosimeters vereinfacht sich die Gleichung, da die Gerätekonstante K eliminiert wird. Mißt man bei so geringen Konzentrationen, daß die Dichteänderung der Lösung gegenüber dem Lösungsmittel vernachlässigbar klein ist, so kann für $\rho = \rho_L$ gesetzt werden. Dann ist:

$$\eta_{sp} = \frac{t}{t_L} - 1$$

wobei die Durchlaufzeit der Lösung und t_L die des Lösungsmittels ist (Annäherung der Werte durch Absinken der Viskosität der Enzym-Substratlösung auf t_L).

2. Ausführung

Viskositätsbestimmung (modifiziert nach R. N. FEINSTEIN, 1960)

Stammlösungen:

- 1.) Veronal-Acetat-Puffer (Veronal/Natriumacetat 1 : 1
mit $n/10$ HCl auf pH 6.4 eingestellt)
- 2.) hochpolymere Thymus-DNS 1 mg/ml (Zusatz von Veronal-Acetat-Puffer zu gleichen Teilen als Substratlösung für das Enzym.)

Im folgenden wurde nun die gelöste Thymus-DNS (1 mg Trockensubstanz in 1 ml Aqua dest. gelöst) zu gleichen Teilen mit Veronal-Acetat-Puffer gut gemischt; von dieser Lösung wurden 2.0 ml in ein Reagenzglas gebracht und mit 2.0 ml der Enzymlösung inkubiert.

In demselben Augenblick, in dem das DNase haltige Sekret in die DNS-Substratlösung einpipettiert wurde, wurde gleichzeitig eine Stoppuhr (1) in Gang gesetzt, die über die gesamte Dauer des Versuches lief. Von den 4.0 ml der Substrat-Enzymlösung wurden 3.0 ml möglichst rasch in ein Ostwald-Viskosimeter gebracht, das im Wasserbad bei einer konstanten Temperatur von 21°C gehalten wurde. Mit einer zweiten Stoppuhr (2) wurde nun sofort nach dem Einpipettieren in das Viskosimeter die Durchlaufzeit gestoppt. Im weiteren wurde nun in Zeitabständen von 70 bis 300 sec. so oft wie möglich die Messung der Durchlaufzeit wiederholt. Dabei ist die Zahl der Wiederholung des Zeitnehmens von der Aktivität der Enzymlösung abhängig.

Bei jedem erneuten Messen der Durchlaufzeit wurde die Zeit t_0 notiert (Stoppuhr 1), die seit Beginn der Reaktion verstrichen war. Die dazugehörige Durchlaufzeit ist t . Dann ergibt $t_0 + \frac{t}{2} = t'$, ein Wert, der bei der graphischen Ermittlung von $R/2$ auf der metrisch eingeteilten Abszisse aufgetragen wurde. Die einzelnen Werte der Durchlaufzeit dividiert man nun durch die Durchlaufzeit t_L der Pufferlösung und erhält dann nach der

$$\text{Gleichung } n_{sp} = \frac{t}{t_0} - 1 \quad \text{die spezifische Viskosität } n_{sp}.$$

Dieser Wert wird nun auf der logarithmischen Einteilung der Ordinate gegen das zugehörige t' aufgetragen.

Der Punkt, in dem die Kurve die Ordinate schneidet, ist ein Näherungswert und bedeutet R. Nun wird durch $R/2$ eine Parallele zur Abszisse gezogen, die die Kurve in x schneidet. Eine Senkrechte auf die Abszisse ergibt den Wert für $R/2$ für 2 ml der Enzymlösung. Die Enzymaktivität wird nun entweder in $R/2$ ausgedrückt (das ist die Zeit, die benötigt wird, um die Ausgangsviskosität der Lösung auf die Hälfte zu reduzieren), oder in Enzymeinheiten (EE), die als $\frac{100}{R/2}$ definiert werden, wobei für eine Enzymeinheit $R/2$ mit 100 sec. zu Grunde gelegt wird.

3. Beispiel der Berechnung von $R/2$

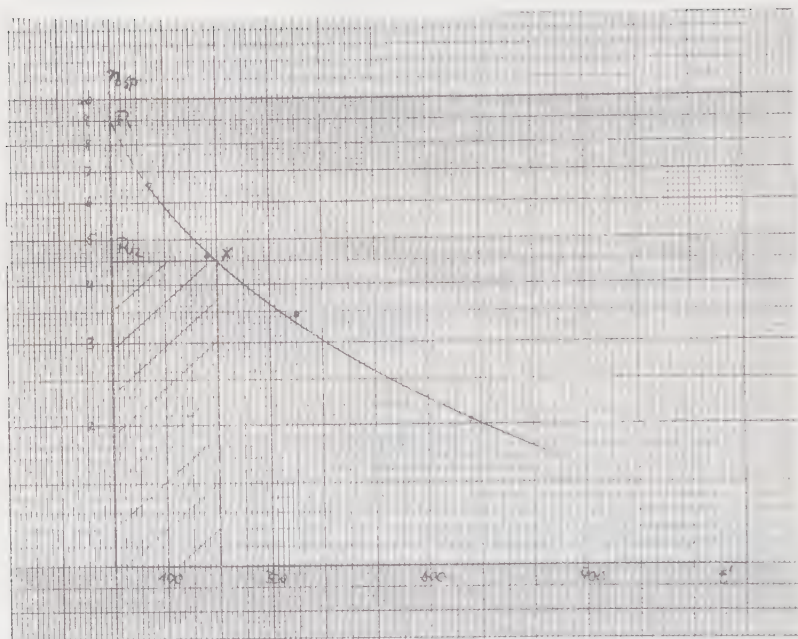
Tabelle 7

Zeit nach der Inkubation	Durchlauf- zeit	$t_o + \frac{t}{2}$	$\frac{t}{t_L} - 1$
t_o	t	t'	n_{sp}
35 ''	62.5 ''	66.25	0.66
150 ''	55.0 ''	177.5	0.47
300 ''	50.5 ''	325.2	0.345
600 ''	45.2 ''	622.6	0.205

Die Durchlaufzeit der Pufferlösung betrug 37.5 sec. Nach der graphischen Ermittlung ergibt sich $R/2 = 200$; $EE = 7.5$ pro ml Sekret. Das Sekret war dabei 1 : 10 mit Aqua dest. verdünnt.

Abbildung 3

Graphische Ermittlung von $R/2$



F. Weitere Methoden

Auf Grund der verschiedenen Ergebnisse bei den beiden bekannten Enzymen Pankreas-DNase und Thymus-DNase (siehe Einleitung) war es notwendig, Voruntersuchungen zur Charakterisierung der DNase in den untersuchten Geschlechtssekreten durchzuführen.

1. Bestimmung des pH-Optimums

Zur Ermittlung des pH-Optimums bei Ampullen- und Nebenhodensekret wurde Veronal-Acetat-Puffer verwendet, der mit 1/10 n HCL auf verschiedene pH-Werte zwischen pH 5,6 und pH 7,2 eingestellt worden war. Als Prüfgerät diente ein 2-Elektroden-pH-Meter.

Diese Puffer mit verschiedenen pH-Werten wurden jeweils mit der gelösten DNS (1 mg/ml) im Verhältnis 1 : 1 gemischt, anschließend mit dem DNase haltigen Sekret inkubiert und in das Viskosimeter einpipettiert. (Siehe Seite 40)

2. Einfluß von Magnesium- und Zitrat-Ionen

Zur Prüfung der Magnesium-Abhängigkeit wurden vor der Inkubation der DNS dem DNase haltigen Sekret steigende Mengen $MgSO_4$ zugesetzt (0,0005 - 0,04 m $MgSO_4$). In gleicher Weise wurden Versuche mit Zitrat durchgeführt. Dabei wurden Konzentrationen von 0,001 bis 0,1 m Natrium-Zitrat verwendet.

Entsprechend den Ergebnissen, wie sie über den Gehalt an Magnesium und Zitrat in der Ampulle vorliegen, wurde $MgSO_4$ und Natrium-Zitrat kombiniert zugesetzt. Die Versuche wurden dabei mit gleichbleibenden $MgSO_4$ Konzentrationen und steigenden Mengen Natrium-Zitrat (150 - 1 200 mg/%) vorgenommen.

3. Proteinbestimmung

Um einen gemeinsamen Bezugswert zu erhalten, wurde von allen Sekreten und Homogenaten eine Proteinbestimmung mit Hilfe der Biuret-Reaktion durchgeführt. Dabei wurden jeweils Mengen zwischen 0,1 und 0,9 ml des Untersuchungsmaterials auf 0,9 ml Aqua dest. aufgefüllt, und die darin enthaltenen Proteinbestandteile mit 0,1 ml 0,3 m Trichloressigsäure (TCE) ge-

fällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand zur Kenntnis genommen. Anschließend wurde mit 4,0 ml Aqua dest. zugefügt, der Niederschlag vom Boden des Zentrifugenglases mit einem Glasstab abgelöst, und diese Suspension mit 5 ml Biuret-Reagenz gründlich gemischt. Die so erhaltene Lösung blieb mindestens 30 Minuten stehen. Nach dieser Zeit wurde die Extinktion am Photometer Eppendorf bei 540 mμ und 1 cm Schichttiefe gegen Biuret-Reagenz + Aqua dest. im Verhältnis 1 : 1 gemessen.

Der Proteingehalt in mg errechnete sich durch Multiplikation der Extinktion mit dem empirisch gefundenen Faktor 17.

4. Auswertung von Meßergebnissen

Für die Berechnung der Ergebnisse wurden folgende Bezugsgrößen zu Grunde gelegt:

Mittelwert $\bar{x} = \frac{\sum Sx}{n}$, wobei n die Stichprobenzahl und $\sum Sx$ die Summe der Einzelwerte darstellt.

Die Varianz s^2 wurde nach der Formel

$$s^2 = \frac{\sum Sx^2 - \bar{x} \cdot \sum Sx}{n - 1} \quad \text{berechnet. (OTTO, 1958)}$$

Für die Prüfung der Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen wurde der Wilcoxon-Test angewandt. (GEIGY, 1960)

IV. ERGEBNISSE

A. Einfluß des pH auf die DNase-Aktivität im Inhalt von Samenleiterampulle und Nebenhodenschwanz

Tabelle 8pH - Optimum

pH	EE/ml Amp.inh.	EE/ml Nebenh.inh.
5.6	8.25	4.0
6.0	9.9	5.0
6.4	10.6	6.12
6.8	3.0	3.5
7.2	0.6	0.31

EE = Enzymeinheiten

EE/ml = Enzymeinheiten pro ml des jeweils verwendeten Sekretes

Die Bestimmung des pH-Optimums der DNase-Aktivität (siehe Seite 43) ergab für den spermienfreien Inhalt von Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle korrespondierende Werte bei einem Optimum zwischen pH 6.0 und pH 6.4. Bei Werten unter pH 5.6 und besonders über pH 6.6 war die Aktivität der DNase wesentlich geringer. Orientierende Messungen im sauren Bereich bis pH 5.0 zeigten, daß die Enzymaktivität gegenüber derjenigen im pH-Optimum auch hier erniedrigt war. Die Werte des Gesamtgemisches (DNS + DNase haltiges Sekret + Puffer) lagen dabei um 0.1 bis 0.2 pH niedriger als diejenigen der eingestellten Pufferlösung. Für alle folgenden Bestimmungen wurde deshalb eine Pufferlösung von pH 6.4 verwendet.

Über die Unterschiede der DNase-Aktivitäten, wie sie in diesem Beispiel zwischen Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle auch über verschiedene pH-Stufen zum Ausdruck kommen, siehe Tabelle 22.

B. Einfluß der Magnesium- und Zitratkonzentration auf die DNase-Aktivität

Die Magnesium-Abhängigkeit der DNase-Aktivität in den hier untersuchten Sekreten entspricht den Befunden, wie sie auch bei Thymus-DNase festgestellt worden waren. Es zeigte sich keine stimulierende Wirkung auf die Aktivität der DNase, wie sie für die Pankreas-DNase bekannt ist. Dagegen war eine deutliche Hemmung bei Zusatz steigender Mengen Magnesium-Sulfat festzustellen (siehe unten).

1. DNase-Aktivität im spermienfreien Ampulleninhalt bei Zusatz verschiedener MgSO_4 -Mengen

Tabelle 9

MgSO_4	EE/ml Ampulleninhalt
0,04 m	0,000
0,02 m	0,000
0,01 m	0,525
0,005 m	1,05
0,001 m	3,6
0,0005 m	5,4
ohne Magnesium	9,9

Es zeigte sich also bei der Verringerung der Magnesiumkonzentration eine deutliche Erhöhung der DNase-Aktivität, die bei der Bestimmung ohne Zusatz von MgSO_4 mit $\text{EE} = 9,9$ ihren höchsten Wert erreichte.

2. DNase - Aktivität im Ampulleninhalt
bei Zusatz von Natrium - Zitrat

Tabelle 10

Natrium-Zitrat	EE/ml Ampulleninhalt
0.1 m	0.000
0.01 m	2.7
0.001 m	3.75
ohne Natrium-Zitrat	4.9

Bei Zusatz von Natrium-Zitrat in verschiedenen Konzentrationen - ohne MgSO_4 - zeigte sich bei relativ hohen Konzentrationen ebenfalls eine zunehmend hemmende Wirkung auf die Aktivität der DNase.

3. Wirkung von Natrium-Zitrat + MgSO_4
auf die DNase-Aktivität

Tabelle 11

Magnesiumsulfat	Natrium-Zitrat	EE/ml AI ⁺
8.5 mg ‰ (0.003 m)	--- --	2.4
8.5 mg ‰ (0.003 m)	150 mg ‰ (0.0071 m)	2.4
8.5 mg ‰ (0.003 m)	300 mg ‰	2.4
8.5 mg ‰ (0.003 m)	600 mg ‰	2.4
8.5 mg ‰ (0.003 m)	1200 mg ‰ (0.0568 m)	0.6

⁺ AI = Ampulleninhalt

In Anlehnung an Magnesium- und Zitratkonzentrationen, wie sie nach Untersuchungen von CRAGLE und SALISBURY (1933) und von MANN, LUTWAK-MANN (1948 a) für den Inhalt der Samenleiförampulle bekannt sind, wurde $MgSO_4$ und Natrium-Zitrat kombiniert zugesetzt.

Bei gleichbleibender Magnesium-Konzentration ($8,7 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) und einem steigenden Gehalt an Natrium-Zitrat von 100, 200 und 300 $\text{mg}/100 \text{ ml}$ ergab sich ein gleichbleibender DNase-Aktivitätswert von $FE = 2,4 \text{ (ml Sekret)}$. Dieser Wert entspricht dem Zusatz von $8,7 \text{ mg}$ Magnesium-Sulfat ($0,003 \text{ m}$) pro 100 ml Sekret, ohne Natrium-Zitrat. Das bedeutet, daß unter diesen Bedingungen das zugesetzte Natrium-Zitrat in den oben genannten Konzentrationen weder auf die vorhandenen Magnesium-Ionen noch auf die Enzym-Aktivität eine sichtbare Wirkung hatte. Erst eine Konzentration von 1 200 mg Natrium-Zitrat pro 100 ml bewirkte eine beträchtliche Hemmung der DNase-Aktivität.

Ergänzend sei erwähnt, daß bei Zusatz von 0,000 m Zink-Sulfat - entsprechend den Versuchen mit Magnesiumsulfat - keine nennende Wirkung auf die Enzym-Aktivität beobachtet werden konnte.

C. Bestimmung der DNase-Aktivität in verschiedenen
Sekreten, Spermien und Ejakulat

1. Inhalt des Nebenhodenschwanzes
(direkte Entnahme)

Tabelle 12

		<u>Enzymeinheiten pro</u>			
mg Prot./ml	10^8 Sperm.	ml Sekr.	mg Prot.	10^8 Sperm.	
15,70	46,2	3,125	0,199	0,0676	
24,0	50,2	4,0	0,166	0,079	
22,62	45,1	5,0	0,221	0,111	
23,50	42,9	4,5	0,191	0,105	
21,85	48,5	3,55	0,162	0,073	
$\bar{x}$ 21,53	46,58	4,035	0,187	0,087	
n 5	5	5	5	5	
s^2 3,82	231,7	0,7	0,0008	0,0001	

Die gemessenen Werte der Enzym-Aktivität im spermienfreien Inhalt des Nebenhodenschwanzes liegen alle in derselben Größenordnung. Bemerkenswert ist die Übereinstimmung der Enzymeinheiten pro mg Protein bei Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle (Tabelle 14). Der Unterschied der Aktivitätswerte pro ml Inhalt zwischen Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle ist signifikant und bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ statistisch gesichert.

2. Inhalt der Samenleiterampulle

Tabelle 13

<u>Zusatz von 0,005 m MgSO_4</u>		<u>Enzymeinheiten pro</u>	
mg Protein		ml Sekret	mg Protein
36,42		1,6	0,0438
41,28		1,3	0,0315
-----		2,2	-----
36,84		1,25	0,03400
32,57		4,22	0,1295
-----		1,50	-----
43,50		1,40	0,0322
-----		2,8	-----
40,20		3,3	0,0820
$\bar{x}$	38,46	2,16	0,0588
n	6	9	6
s^2	15,99	1,14	0,0016

Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die DNase-Aktivität im Ampullensekret bei Zusatz von 0,005 m MgSO_4 . Mit einem Durchschnitt der Enzym-Aktivität von $\text{EE} = 2,17$ pro ml liegen diese Werte noch erheblich unter denen, die in Tabelle 14 für Ampulleninhalt ohne Magnesium-Zusatz aufgeführt sind.

Tabelle 14

ohne Magnesium-Zusatz			Enzymeinheiten pro		
mg	Prot./ml	10^8 Sperm.	ml Sekr.	mg Prot.	10^8 Sperm.
	35.36	25.0	6.6	0.1867	0.257
	47.77	34.6	6.6	0.1382	0.190
	42.84	26.0	9.3	0.2175	0.354
	45.28	34.0	8.4	0.1860	0.247
	30.77	34.8	6.0	0.1950	0.172
	35.25	33.2	9.9	0.3582	0.304
	39.10	37.1	9.9	0.2530	0.251
	35.18	28.2	8.2	0.2340	0.290
	47.40	32.6	4.0	0.0855	0.124
	41.20	35.2	6.3	0.1530	0.178
	38.70	30.0	7.5	0.1940	0.250
$\bar{x}$	39.89	31.88	7.52	0.2001	0.2379
n	11	11	11	11	11
n^2	21.95	15.35	3.35	0.0044	0.04

Wie aus Tabelle 14 zu ersehen ist, finden sich die höchsten Werte der Enzym-Aktivität im Inhalt der Samenleiterampulle (ohne Zusatz von $MgSO_4$). Diese Werte sind nahezu doppelt so hoch wie im Inhalt des Nebenhodenschwanzes (Tabelle 12) bei der direkten Entnahme des Inhalts. Bezieht man die Werte auf den Proteingehalt, wie er in den verschiedenen Proben von Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle gefunden wurde, so ergaben sich bei beiden annähernd gleiche Werte. Bezieht man sie auf die Spermindichte, ergibt sich im Ampulleninhalt als Durchschnittswert eine Konzentration pro Spermium, die 2.73 mal höher ist als im Nebenhoden (Tabelle 12). In diese Befunde ist sowohl die geringere Spermindichte, als auch der höhere Proteingehalt im Ampullenmilieu bereits einbezogen.

3. Vesikulardrüsensekret

Tabelle 15

		Enzymeinheiten pro	
mg Protein	ml Sekret	mg Protein	
78,88	0,9	0,0114	
48,14	0,5	0,0104	
72,93	1,5	0,0206	
77,34	0,65	0,0084	
95,10	2,0	0,0210	
98,10	1,35	0,0138	
50,10	1,43	0,0286	
59,40	1,75	0,0295	
65,72	1,26	0,0192	
71,26	1,58	0,0221	
Ø 71,69	Ø 1,29	Ø 0,0185	
$\bar{x}$ 71,69	1,29	0,0185	
n 10	10	10	
n^2 282,58	0,19	0,00005	

Im Sekret der Vesikulardrüsen wechseln die Werte für die Enzym-Aktivität ziemlich stark und reichen von $EE = 0,5$ bis $EE = 2,0$. Der Proteinanteil ist bei einem Durchschnittswert von 71,69 mg Protein/ml ungefähr doppelt so hoch wie im Ampulleninhalt und 3,5 mal so hoch wie im Inhalt der Nebenhoden. Dadurch erniedrigt sich die durchschnittliche DNase-Aktivität pro mg Protein auf etwa 1/10 der Werte vom Ampulleninhalt.

4. Samenplasma

Tabelle 16

		Enzymeinheiten pro			
mg Prot./ml	10^8 Sperm.	ml Sekret	mg Prot.	10^8 Sperm.	
51.58	11.0	3.5	0.0676	0.318	
87.21	10.2	5.0	0.0572	0.495	
97.20	19.4	3.8	0.0391	0.198	
60.25	13.3	2.0	0.0332	0.152	
55.42	18.5	5.3	0.0958	0.286	
38.42	12.0	3.8	0.0900	0.316	
52.87	15.4	3.8	0.0766	0.246	
36.55	11.1	3.5	0.0960	0.315	
47.90	14.0	2.5	0.0532	0.178	
45.90	12.4	4.0	0.0872	0.322	
59.00	15.5	2.9	0.0492	0.187	
41.30	11.8	2.0	0.0485	0.168	
48.60	12.4	3.8	0.0790	0.311	
53.30	12.1	1.5	0.0281	0.124	
$\bar{x}$	55.39	13.50	3.389	0.0643	0.2511
n	14	14	14	14	14
s^2	385.6	6.96	1.04	0.0001	0.012

Die gemessenen Werte im Samenplasma werden durch die Sekretanteile der vorhergehenden Drüsen bestimmt. Das kommt auch in Tabelle 16 zum Ausdruck. Mit der Verdünnung des Ampulleninhaltes durch das hinzukommende Vesikulardrüsensekret, das einen hohen Proteingehalt aufweist (siehe Tabelle 15), wird die Enzymaktivität pro mg Protein wesentlich erniedrigt, pro Spermium jedoch erhöht und liegt damit in derselben Größenordnung, wie sie auch im Inhalt der Samenleiterampulle festgestellt wurde. (siehe Tabelle 12). Als weitere Folge liegen auch die Aktivitätswerte pro ml Samenplasma zwischen den Werten von Samenleiterampulle und Vesiku-

5. Spermien

Tabelle 17

DNase-Aktivität bei

a) zerschlagenen Spermien

Enzymeinheiten pro

ml Sperm. Ansatz bzw. 10^8 Sperm.

0.006	0.005
0.0001	0.00008
0.0115	0.0009

b) gewaschenen Spermien

Enzymeinheiten pro

ml Sperm. Ansatz bzw. 10^8 Sperm.

0.0165	0.0013
0.0043	0.0003
0.0100	0.0008
0.0370	0.0030
0.0260	0.0021
0.0080	0.0006
0.0330	0.0027
0.0075	0.0006
0.0300	0.0025

$\bar{x}$	0.01903	0.00123
-----------	---------	---------

Die obenstehenden Ergebnisse resultieren ohne $MgSO_4$ -Zusatz, da bei orientierenden Messungen mit Magnesium bei dieser Methode keine Aktivität gemessen werden konnte. Auch ohne Zusatz von Magnesium ergaben sich sowohl bei zerschlagenen, als auch bei gewaschenen Nebenhoden- und Ampullenspermien nur sehr niedrige Werte. Der Durchschnitt aller Werte lag unter 0.002 EE/ml der Spermiesuspension.

D. Ergebnisse der Untersuchung der DNase-Aktivität in verschiedenen Gewebshomogenaten

1. Nebenhodenhomogenat

Bei der Untersuchung von Nebenhoden- und Ampullendrüsenhomogenat wurden - entsprechend den Ansprüchen zur Bestimmung von Pankreas-DNase - anfangs auch Versuche mit Magnesium-Zusatz durchgeführt. Dabei lagen die Werte für die Nebenhoden zwischen 0,000 und 0,005 EE/ml, zeigten also nur eine sehr geringe Enzym-Aktivität. Wie auch die Erfahrungen mit Ampullensekret gezeigt haben, ergaben sich bei Zusatz von Magnesiumsulfat keine verwertbaren Aktivitätswerte.

Tabelle 18

mg Prot./ml	Enzymeinheiten pro	
	ml Sekret	mg Protein
6.97	0.115	0.0165
8.50	0.625	0.0735
6.36	0.650	0.1020
9.14	0.70	0.0766
9.21	0.85	0.0922
----	0.80	-----
----	1.30	-----
6.88	0.50	-----
9.33	0.44	0.047
----	0.31	-----
$\bar{x}$ 8.05	0.629	0.0686
n 7	10	7
s ² 1.84	0.105	0.0007

Ohne Zusatz von Magnesium ergaben sich eindeutig nachzuweisende Aktivitätswerte, die jedoch sehr große Unterschiede aufweisen und auch keine Beziehung zu der Spermiendichte und zu dem Proteingehalt erkennen lassen.

2. Ampullendrüsenhomogenat

Tabelle 19a) Zusatz von 0,005 m MgSO_4

Enzymeinheiten pro	
ml Sekr.	mg Prot.
0,125	0,0032
0,10	0,0028

b) ohne Zusatz von MgSO_4

Enzymeinheiten pro	
ml Sekr.	mg Prot.
4,0	0,108
5,0	0,121
2,0	0,055
4,0	0,093
1,25	0,029
1,26	0,025
2,0	0,046
0,83	0,021

$\bar{x}$	2,54	0,0623
n	8	8
s^2	2,45	0,001

In Tabelle 19 a) sind zwei Vergleichswerte zur DNase-Aktivität im Ampullendrüsenhomogenat bei Zusatz von MgSO_4 aufgeführt. Der Vergleich mit Tabelle 19 b) macht die Aktivitätshemmung beim Zusatz von Magnesium deutlich (siehe auch Abbildung 4).

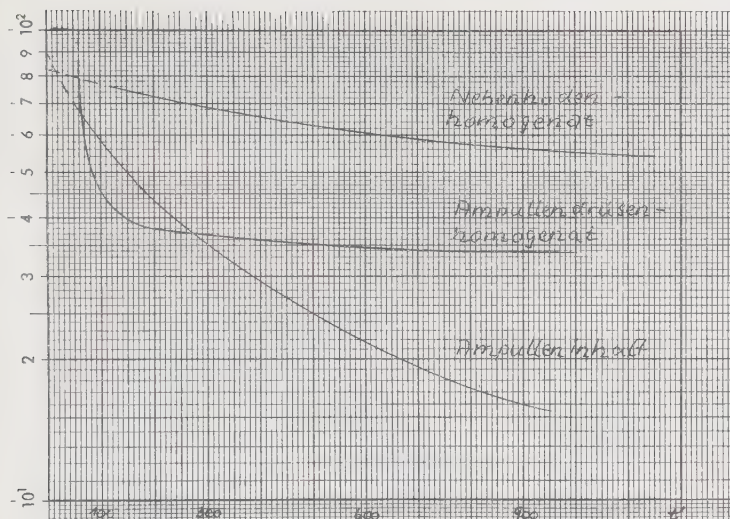
Abbildung 4

Abbildung 4 zeigt die starke Anfangsreaktion bei Ampullendrüsenhomogenat gegenüber Nebenhodenhomogenat und Ampulleninhalt.

3. Vesikulardrüsenhomogenat

Tabelle 20

mg Prot./ml	Enzymeinheiten pro	
	ml Sekret	mg Protein
49.80	0.015	0.00030
47.25	0.04	0.00084
50.00	1.0	0.020
48.50	0.62	0.012
$\bar{x}$ 48.88	0.418	0.00828
n 4	4	4

Wie bei allen Homogenaten in diesen Untersuchungen weisen auch die einzelnen Werte von dem Homogenat der Vesikulardrüsen starke Unterschiede auf.

4. Homogenat von Prostata und Bulbourethraldrüsen

Tabelle 21

Prostata		Bulbourethr. dr.	
Enzymeinheiten pro ml Sekret	mg Protein	Enzymeinheiten pro ml Sekret	mg Protein
0.5	0.0148	0.23	0.0101
0.47	0.0213	0.10	0.0058
1.6	0.0292	0.25	0.0156

Um Anhaltspunkte für Vergleiche zwischen der DNase-Aktivität im Ejakulat und im Inhalt der Samenleiterampulle zu bekommen, wurden einige Stichprobenversuche vom Prostata- und Bulbourethraldrüsenhomogenat, ohne Zusatz von Magnesium, durchgeführt (siehe Tabelle 21).

Werden die Enzymeinheiten auf mg Protein bezogen, so erhält man Werte, die mit denen der Vesikulardrüsen zu vergleichen sind. Sie liegen also wesentlich niedriger als dieselben Bezugsgrößen bei dem Inhalt von Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle.

E.. Gegenüberstellung der Mittelwerte von den Enzym-Aktivitäten
in den verschiedenen Abschnitten

Tabelle 22

Enzymeinheiten pro

ml Sekret mg Protein 10^8 Sperm.

Spermien aus Nebenhoden-
schw. u. Samenleiterampulle:

a) gewaschen	-----	-----	0.0012
b) zerschlagen	-----	-----	0.0019
Nebenhodenschwanz-Inhalt	4.035	0.187	0.0871
Nebenhodenhomogenat	-----	0.068	-----
Samenleiterampullen-Inh.	7.52	0.200	0.238
Ampullendrüsenshomogenat	-----	0.062	-----
Vesikulardrüsensekret	1.29	0.0185	-----
Vesikulardrüsenshomogenat	-----	0.0082	-----
Prostatahomogenat	-----	0.0217	-----
Bulbourethraldrüsenshomog.	-----	0.0108	-----
Samenplasma	3.389	0.0643	0.251

Aus der Gegenüberstellung der Mittelwerte geht hervor, daß die Samenleiterampulle mit $EE = 7.5$ die höchsten Aktivitätswerte aufweist. An nächster Stelle stehen Nebenhodenschwanz mit $EE = 4.03$ und Samenplasma mit $EE = 3.23$. Der Unterschied der Aktivitätswerte pro ml Inhalt zwischen Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle ist signifikant und bei einer Zufallswahrscheinlichkeit von $P < 0.05$ statistisch gesichert.

Die Übereinstimmung des Inhalts von Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle in Bezug auf EE/mg Protein einerseits, und des Inhalts der Samenleiterampulle und Samenplasma bei $EE/10^8$ Spermien auf der anderen Seite, wurde bereits bei Tabelle 12 und Tabelle 14 erwähnt.

Alle Untersuchungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, ohne Zusatz von Magnesium durchgeführt. Untersuchungen über die Enzym-Aktivität im Vesikulardrüsensekret und Samenplasma mit Zusatz von 0.005 m MgSO_4 verliefen ergebnislos, da sich sofort nach der Zugabe des Sekretes zu der DNS-Pufferlösung ein Niederschlag bildete, der die Viskositätsmessung unmöglich machte. Vermutlich handelte es sich um eine Ausfällung der DNS.

F. Ergebnisse der Untersuchungen über die DNase-Aktivität
bei drei Bullen nach partieller und totaler Kastration

Von der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München wurden dank der Vermittlung von Herrn Professor Dr. Leidl Ejakulatproben von drei Bullen zur Verfügung gestellt, die aus einem dortigen Versuch mit Testesbestrahlung stammten und regelmäßig abgesamt wurden.

Diese drei Bullen wurden dabei zuerst einseitig und nach vier Wochen vollständig kastriert. Bei Beginn der Untersuchungen war Bulle I schon acht Tage beidseitig, die Bullen II und III waren dagegen nur einseitig kastriert. Soweit genügend Sperma vorhanden war, wurde das Ejakulat zweimal wöchentlich untersucht.

Tabelle 23

Bulle I

Datum	ml Ejakulat	mg/ml Protein	Enzymeinheiten pro		
			ml	mg Prot.	Fructose %
17. IX.	einseitige Kastration				
17. X.	vollständige Kastration				
25. X.	1.5	0.00	0.00	0.00	--,-
29. X.	4.0	39.50	0.425	0.0107	54.0
31. X.	1.0	4.75	0.00	0.00	--,-
5. XI.	---	---	---	---	13.0
12. XI.	2.0	44.10	0.00	0.00	46.8
15. XI.	1.0	35.70	0.75	0.021	27.0
19. XI.	0.5	---	0.375	---	7.2
22. XI.	1.0	17.90	0.08	0.0045	--,-
26. XI.	1.5	1.36	0.00	0.00	--,-
29. XI.	0.7	13.92	0.157	0.0128	--,-

Tabelle 24

Bulle II

Datum	ml Ejakulat	mg/ml Protein	Enzymeinheiten pro		
			ml	mg Prot.	Fructose mg%
27. IX.	einseitige Kastration				
25. X.	3.0	41.90	0.65	0.0155	446.0
27. X.	vollständige Kastration				
29. X.	2.7	66.20	0.003	0.00005	108.0
31. X.	2.0	28.70	0.225	0.0078	19.8
5. XI.	4.7	41.60	0.125	0.003	54.0
8. XI.	1.5	34.80	0.24	0.007	47.0
12. XI.	2.7	56.40	0.00	0.00	41.4
15. XI.	1.5	47.20	0.135	0.0028	43.2
19. XI.	0.5	51.00	0.297	0.0078	277.2

Tabelle 25

Bulle III

			Enzymeinheiten pro		
Datum	ml Ejakulat	mg/ml Protein	ml	mg Prot.	Fructose mg%
7. X.	einseitige Kastration				
25. X.	4.5	44.10	0.25	0.0057	843.0
29. X.	4.0	47.50	0.10	0.0021	920.0
5. XI.	3.0	49.20	0.20	0.0040	960.0
6. XI.	vollständige Kastration				
8. XI.	3.0	62.50	0.00	0.000	417.0
12. XI.	0.7	-----	-----	-----	192.0
15. XI.	1.5	47.40	0.17	0.0034	226.5
19. XI.	2.0	23.20	0.10	0.0043	10.8
22. XI.	4.0	25.00	0.005	0.0002	9.0
26. XI.	4.0	45.00	0.115	0.0025	-----
29. XI.	1.0	35.70	0.83	0.023	86.0

Die Tabellen 23 bis 25 zeigen die Ergebnisse über die Untersuchung der DNase-Aktivität im Ejakulat der drei Bullen nach partieller und totaler Kastration. Daneben sind zum Vergleich die Fruktosewerte der entsprechenden Ejakulatproben aufgeführt.

Die Ergebnisse zeigen große Unregelmäßigkeiten, wobei jedoch die totale Kastration nicht entscheidend für die Stärke der Enzymaktivität zu sein scheint, wie es bei den gemessenen Fruktosemengen im großen und ganzen der Fall ist. Die Samenleiterampullen der drei Bullen konnten bei der Schlachtung erhalten werden; es gelang jedoch nicht, Sekretproben daraus zu gewinnen.

Weiterhin standen - ebenfalls aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik - einige Ejakulate eines vasktomierten Bullen zur Verfügung. Gegenüber allen bisherigen Befunden ergaben sich in diesem Fall dadurch überraschende Werte, daß die Enzymeinheiten dieser Proben bei Zusatz von 0,005 m MgSO_4 höhere Enzymaktivitäten zeigten als ohne Magnesiumsulfat. Sie standen damit im Gegensatz zu allen Ergebnissen, wie sie in den vorhergehenden Versuchen bei gesunden Bullen gefunden worden waren.

Bei Zusatz von 0,005 m MgSO_4 lagen die Werte der Enzymaktivität pro ml Ejakulat zwischen 0,91 und 8,32 EE/ml, auf Protein bezogen zwischen 0,024 und 0,218 EE/mg Protein. Zwei Vergleichswerte aus denselben Versuchen - ohne Zusatz von MgSO_4 - waren mit 0,015 und 0,017 EE/ml Ejakulat wesentlich niedriger als bei Anwesenheit von Magnesium-Ionen. Da jedoch keine weiteren Proben zur Verfügung standen, konnte die Frage nach dem Magnesiumgehalt der Ejakulate und der Magnesium-Abhängigkeit der Enzym-Aktivität nicht geklärt werden.

V. DISKUSSION

A. Charakterisierung des Enzyms

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse über Viskositätsmessungen bei DNS, die mit Sekreten aus den Geschlechtsorganen von Bullen inkubiert worden war, konnte das Vorkommen eines Enzyms nachgewiesen werden. Dieses Enzym besitzt offensichtlich die Fähigkeit, hochmolekulare DNS in Bruchstücke mit geringerer Viskosität zu spalten.

Vergleiche mit den Ergebnissen von KUNITZ (1950) über Pankreas-DNase und von JACOBS, BROWN und LASKOWSKY (1952) über Thymus-DNase zeigen - besonders im Hinblick auf das Verhalten bei Anwesenheit von Magnesium - eine gewisse Übereinstimmung mit Thymus-DNase.

Bei der Ermittlung des pH-Optimums nahmen dagegen die erhaltenen Werte eine Zwischenstellung ein. Das pH-Optimum lag mit pH 6,0 bis pH 6,4 über dem Wert der Thymus-DNase mit 5,5 und unter der oberen Grenze der Werte von Pankreas-DNase mit pH 7,0. Diese Zwischenstellung bei dem pH-Optimum entspricht den Werten, wie sie normalerweise in den untersuchten Sekreten vorkommen. BRANTON (1946) gab dabei für den Inhalt der Samenleiterampulle pH 5,9 und für die Nebenhoden pH 6,0 als Durchschnittswert an.

Bei den Untersuchungen über die Magnesium-Abhängigkeit zeigten die Ergebnisse (siehe Tabelle 9), daß durch zugesetzte Magnesium-Ionen keine Aktivierung dieses Enzyms stattfindet. So wurde auch die Enzym-Wirksamkeit in der angesetzten Verdünnung von dem spermienfreien Inhalt der Samenleiterampulle, im Gegensatz zu derjenigen der bekannten Pankreas-DNase, durch Zugabe von 0,1 bis 10,0 μ mol Äthylendiamintetraessigsäure (EDT) nicht gehemmt. Das bedeutet, daß auch bei Bindung vorhandener Magnesium-Ionen durch diesen zugesetzten Chelatbildner die Enzymaktivität nicht verändert wurde. Die Enzym-Aktivität scheint demnach von einer etwaigen stimulierenden oder hemmenden Wirkung nativer Magnesium-Ionen unabhängig zu sein.

Mit höherer Magnesium-Konzentration (etwa ab 0.0005 m MgSO_4) konnte jedoch in der verdünnten Enzymlösung eine zunehmend hemmende Wirkung auf die Aktivität des Enzyms beobachtet werden. Dieser kritische Konzentrationsbereich liegt, nach Angaben von SALISBURY (1958) und übereinstimmenden Ergebnissen aus dem hiesigen Institut (unveröffentlicht), bereits im Ampullen-Milieu vor, allerdings bei unverdünntem Ampulleninhalt.

Mit dieser hemmenden Wirkung der Magnesium-Ionen auf die Enzym-Aktivität kommt ein ähnliches Verhalten zum Ausdruck, wie es auch bei der bekannten Thymus-DNase festgestellt worden ist, das sich aber eindeutig von dem der Pankreas-DNase unterscheidet (siehe Seite 22 und 23).

In gleicher Weise, wie bei Zusatz von MgSO_4 , wurde die Wirkung von Natrium-Zitrat geprüft. Auch hier zeigte sich in dem verdünnten Inhalt der Samenleiterampulle mit steigender Konzentration eine vermehrte Hemmung der Enzym-Aktivität (siehe Tabelle 10).

Bei weiteren Versuchen wurden MgSO_4 und Natrium-Zitrat kombiniert zugegeben. Die Magnesium-Konzentration wurde dabei konstant bei 8.5 mg% gehalten. Die Hemmwirkung fand hier bei Natrium-Zitrat-Zusatz von 150, 300 und 600 mg% keine zusätzliche Steigerung. Der Zusatz von Natrium-Zitrat in diesen Konzentrationen würde dabei Werten entsprechen, die zwei bis vier mal höher sind, als sie normalerweise im Ampullensekret gefunden werden. Erst bei einer Natrium-Zitrat-Konzentration von 1 200 mg%, in Kombination mit Magnesium, ergab sich eine zusätzliche Hemmung des Enzyms.

Daraus ergibt sich, daß bei Magnesium- und Zitrat-Konzentrationen, wie sie in den unverdünnten Sekreten gefunden werden, eine - teilweise - Hemmung der Enzym-Aktivität praktisch durch die Wirkung der Magnesium-Ionen zustande kommen könnte. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß im Inhalt der Samenleiterampulle, trotz Zusatz von Magnesium-Sulfat, die Enzym-Aktivität deutlich zum Durchbruch kam (siehe Tabelle 13).

Insgesamt muß allerdings die Tatsache berücksichtigt werden, daß in vitro mit der Verdünnung der Sekrete andere Voraussetzungen gegeben waren, als es in vivo im Ampullen-Milieu vermutlich der Fall ist,

B. Herkunft des Enzyms

Zur Frage nach der Herkunft des Enzyms ergibt sich aus der Zusammenstellung in Tabelle 22 die Schlußfolgerung, daß das Vorkommen des Enzyms in der Hauptsache nicht an die Spermien gebunden ist. Dafür spricht die äußerst geringe Aktivität bei gewaschenen und verschlagenen Spermien aus dem Inhalt von Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle, während die Aktivität der Gesamthalte wesentlich höher ist. Beim Vergleich der Enzymeinheiten ergibt sich für die auf Protein bezogenen Werte eine weitgehende Übereinstimmung zwischen dem spermienfreien Inhalt von Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle. Diese deutliche Korrelation zwischen Proteingehalt des Inhalts und der Enzymaktivität spricht für eine Sekretion des Enzyms aus den entsprechenden Drüsenabschnitten.

Ähnlich sind die Beziehungen zwischen Enzymgehalt der Geweishomogenate von Nebenhodenschwanz und Ampullendrüsen. Auch hier liegen die Proteinbezugswerte in der gleichen Größenordnung. Doch ist im Nebenhodenhomogenat die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymaktivität wesentlich geringer als im Homogenat der Ampullendrüsen. Möglicherweise wird das Enzym aus dem Homogenat der Nebenhoden erst im Laufe der Reaktion freigesetzt, während es im Ampullendrüsenhomogenat bereits in einer Form vorliegt, die eine hohe Anfangsaktivität gewährleistet. Allerdings wird diese starke Anfangsaktivität im Ampullendrüsenhomogenat ziemlich rasch gehemmt, so daß die Enzymkapazität möglicherweise nur zum Teil wirksam wird. Diese Hemmung ist eventuell auf die entstandenen Spaltprodukte zurückzuführen.

Der unterschiedliche Reaktionsablauf (siehe Abbildung 4 Seite 57) in den übrigen Sekreten und Homogenaten ist vielleicht dadurch zu erklären, daß durch geringere Enzymaktivität auch die Menge der entstehenden Spaltprodukte und damit die Hemmung langsamer zur Wirkung kam.

Die Befunde über die Herkunft dieses Enzyms stehen im Gegensatz zu dem Verhalten proteolytischer Enzyme, die von WALDSCHMIDT, KARG und HOFFMANN (1964) im Inhalt von Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle nachgewiesen wurden. Bei der Charakterisierung dieser Fermente konnten die Autoren feststellen, daß die Chymotrypsin ähnliche Enzymaktivität im Nebenhoden noch weitgehend an die Spermien gebunden ist und erst in der Samenleiterampulle zu einem großen Teil freigesetzt wird. Zwi-

schen Enzymaktivität und Spermiedichte besteht dabei eine deutliche positive Korrelation. Im Einklang damit steht auch die geringe proteolytische Enzymaktivität, die im Homogenat der Ampullendrüse gefunden worden ist.

Die Ergebnisse über die Enzym-Aktivität der hier gefundenen DNase in den verschiedenen Abschnitten der männlichen Geschlechtsorgane beim Bullen zeigen, daß im Bereich der Samenleiterampulle die höchsten Aktivitätswerte zu finden sind. Dabei liegt die Wahrscheinlichkeit nahe, daß das Enzym in erster Linie von den Drüsenanteilen der Ampullen, des Nebenhodenschwanzes, und erst in zweiter Linie in den übrigen Abschnitten sezerniert wird. Gleichzeitig ergaben auch histochemische Untersuchungen am hiesigen Institut, daß das Epithel der verschiedenen Drüsenabschnitte beim Nachweis der DNase positive Ergebnisse zeigt.

Die Ergebnisse über die DNase-Aktivität bei den ein- und beidseitig kastrierten Bullen lassen keine eindeutige Aussage zu. Im Vergleich zu den gefundenen Fruktosewerten könnte vermutet werden, daß die Enzymaktivität nicht in dem Maß von der Funktion der Testes abzuhängen scheint wie der Fruktosegehalt dieser Sekrete. Im ganzen sind die gemessenen Enzymaktivitäten sehr viel niedriger als die entsprechenden Werte gesunder Tiere. Die Aussage der Ergebnisse muß jedoch eingeschränkt werden, da die Testes der Tiere bestrahlt worden waren.

Die Werte über die DNase-Aktivität im Ejakulat des vasktomierten Tieres müssen vorläufig als Sonderfall betrachtet werden, da an diesem Tier keine weiteren Untersuchungen mehr durchgeführt werden konnten.

C. Frage nach der physiologischen Bedeutung dieses Enzyms

Die relativ hohen Aktivitätswerte, wie sie besonders im Inhalt der Samenleiterampulle anzutreffen waren, lenken die Aufmerksamkeit auf die Bedeutung, die die Samenleiterampulle für den Spermienstoffwechsel besitzt. Dabei ergibt sich aus Arbeiten von BRÜGGEMANN, WALDSCHMIDT, KARG und SCHAMS (1963, I. u. II. Mittlg.) folgendes:

Ampullenspermien unterscheiden sich von den Nebenhodenspermien durch einen erhöhten Stoffwechsel und erhöhte Motilität. Sie gleichen in ihrer

Stoffwechselaktivität bereits den Ejakulatspermien und demnach schon als gereift anzusehen. Durch den erhöhten Stoffwechsel unterliegen sie aber auch einem verstärkten Abnutzungsprozeß. Da die Ampullenspermien jedoch nicht den Plasmascchutz wie die Ejakulatspermien besitzen, ist ein weiteres bezeichnendes Merkmal der Ampullenspermien eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber Milieu-Änderungen.

Daher erklärt sich wohl auch der hohe Prozentsatz an toten Spermien, wie bereits früher von verschiedenen Autoren festgestellt worden ist. Versuche von LEIDL und BERCHTHOLD (1961), in denen der Zufluß von Spermien aus dem Nebenhodenschwanz in die Samenleiterampulle unterbrochen worden war, machten deutlich, daß die Spermien in der Samenleiterampulle nur relativ kurze Zeit lebensfähig sind. Die Autoren haben in diesem Zusammenhang ausgesprochen, daß in der Ampulle Abbauvorgänge stattfinden können. Dazu sei auch auf die Methode zur Differenzierung von lebenden und toten Spermien mit Bromphenoiblan hingewiesen. Ihr Prinzip beruht auf einer erhöhten Permeabilität der Membran toter Spermien, wie auch der Ampullenspermien überhaupt. Diese erhöhte Permeabilität stellt eventuell eine wesentliche Angriffsmöglichkeit für die DNase dar. Die Annahme einer erhöhten Permeabilität der Ampullenspermien, im Gegensatz zu den Nebenhodenspermien, wird ebenfalls durch die Befunde über den Austritt von Chymotrypsin im Vas deferens unterstrichen.

Insgesamt darf auf Grund der eigenen Ergebnisse über das Vorkommen eines DNS spaltenden Enzyms vermutet werden, daß auch dieses Enzym zu dem destruktiven Milieu in der Samenleiterampulle in besonderer Weise beiträgt.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

- A. Das Vorkommen eines DNS spaltenden Enzyms wurde im Inhalt von Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle, im Vesikulardrüsensekret, Ejakulat und in den Gewebshomogenaten von Nebenhodenschwanz, Ampullendrüsen, Vesikulardrüsen, Prostata und Bulbourethraldrüsen des Rindes untersucht.
- B. Bei der Bestimmung des pH-Optimums ergab sich keine vollständige Identität mit den bisher bekannten DNS spaltenden Enzymen Pankreas- und Thymus-DNase. Die Untersuchung der Magnesium-Abhängigkeit zeigte keine stimulierende Wirkung der Magnesium-Ionen auf die Aktivität des Enzyms; dagegen war bei höherer Magnesiumdosierung - in ähnlicher Weise wie bei Thymus-DNase - eine deutliche Hemmung der Enzymaktivität zu beobachten.
- C. In allen untersuchten Abschnitten, hauptsächlich im Nebenhodenschwanz und der Samenleiterampulle, ergaben sich positive Befunde. An letzter Stelle befanden sich gewaschene und zerschlagene Spermien, die nur sehr geringe Enzym-Aktivität erkennen ließen.
- D. Auf Grund der verschiedenen Kriterien kann angenommen werden, daß dieses Enzym in den untersuchten Abschnitten nicht von Spermien freigesetzt, sondern von dem Epithel der akzessorischen Drüsen - insbesondere von Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle - sezerniert wird. Der geringe Anteil im Vesikulardrüsensekret bewirkt dabei eine Verdünnung der Enzymkonzentration im Samenplasma.

LITERATURVERZEICHNIS

ALLFREY, V. G., MIRSKY, A. E., 1952

"Some aspects of the DNase activities of animal tissues"

J. Gen. Physiol. 36, 227

ARAKY, T., 1903

"Über enzymatische Zersetzung der Nucleinsäure"

U. Physiol. Chem. 38, 84

APOSHIAN, H. V., KORNBERG, A., 1962

"Enzymatic synthesis of Deoxyribonucleic Acid. IX. The polymerase formed after T2-Bacteriophage infection of Escherichia coli. A new enzym"

J. Biol. Chem. 237, 519

BOIVIN, A., VENDRELY, R. 1948

"Arginine and Deoxyribonucleic Acid content of erythrocyte nuclei and sperms of some species of fishes"

Compt. rend. Acad. Paris, 226, 1061

BRANTON, C., 1946

"Physiology and morphology of spermatozoa from different levels of the reproductive tract of the bull"

Master of Sci. Thesis, Cornell Univ., Zit. von Salisbury and Van Demark 1961

BRIL-PETERSEN, E., WESTERBRINK, H. E. K., 1963

"A structural basic protein as a counterpart of deoxyribonucleic acid in mammalian sperm"

Biochim. et Biophys. Acta, 76, 152

BROWN, K. D., JACOBS, G., LASKOWSKY, M., 1952

"The distribution of nucleodepolymerases in calf thymus fractions"

J. Biol. Chem. 194, 445

BRÜGGEMANN, J., WALDSCHMIDT, M., KARG, H., SCHAMS, D. 1963

"Beiträge zur Physiologie der Reifung und des Alterns von Spermien. II. Mitteilung: Versuche zur Charakterisierung der Veränderungen der Spermien zwischen Nebenhodenschwanz und Samenleiterampulle des Rindes unter besonderer Berücksichtigung von Sekreteinflüssen"

Z. bl. f. Vet.med. A. 10, 463

CAVALIERI, L. F., B. HATSCH, 1953

"Studies on the structure of Nucleic Acids. IV. The kinetics of DNase action"

J. Am. Chem. Soc., 75, 1110, 5268

CECIL, R., OGSTON, A. G., 1948

The sedimentation of thymus nucleic acid in the ultracentrifuge"

J. Chem. Soc., 1382

CHARGAFF, E., 1951

"Chemical specificity of Nucleic Acids and mechanism of their enzymatic degradation"

Experientia, 6, 201

CHARGAFF, E. LIPSHITZ, R., 1953

"Compositum of mammalian Desoxyribonucleic Acids"

J. Am. Chem. Soc., 75, 3658

CHARGAFF, E. DAVIDSON, J. N., 1955

"The Nucleic Acids"

Acad. Press. New York

COHN, W. W., VOLKIN, E. 1953

"On the structure of Ribonucleic Acids.

II. The products of RNase action"

J. Biol. Chem., 205, 767

CONWAY, B. E., BUTLER, J. A. V., 1954

"Effect of salts on the interaction of Nucleic Acid particles"

J. Polymer Sci., 12, 199

CRAGLE, R. G., SALISBURY, G. W., MUNZ, J. H., 1958

"Distribution of bulk and trace minerals in bull reproductive tract fluids and semen"

J. Dairy Sci., 41, 1273-1277

CRAGLE, R. G., SALISBURY, G. W., 1959

"Factores influencing metabolic activity of bull spermatozoa. IV. pH, osmotic, pressure and the cations sodium, potassium and calcium"

J. Dairy Sci., 42, 1304-1313

DAVIDSON, J. N., 1960

"The biochemistry of Nucleic Acids"

E. Methuen, London

DAVIDSON, J. N., WAYMOUTH, C., 1943

"Ribonucleic Acids in animal tissues"

Nature, London, 152, 47

DAWSON, R. M. C., MANN, T., WHITE, J. G., 1957

"Glycerolphosphocholin and phosphorylcholin in semen and their relation to cholin"

Biochem. J., 65, 627

DISCHE, Z., 1930

"Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonucleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen"

Mikrochemie, 8, 4

DOTY, BUNCE, B., 1952

"The molecular weight and shape of Desoxypentose Nucleic Acid"

J. Am. Chem. Cos., 74, 5029

ELMES, P. C., WHITE, C. J., 1952

"Fibres of human sodium deoxyribonucleate and nucleoprotein studied in polarized light by a simple method"

Nature, 169, 151

FEINSTEIN, R. N., 1960

"Activation of the neutral Deoxyribonuclease"

J. Biol. Chem., 235, 733

FELIX, K., KREKELS, A., 1952

"Nucleoprotamin III. Mitteilung"

Z. Physiol. Chem., 289, 127

FEULGEN, R., ROSENBECK, H., 1924

"Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende selektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten"

"Z. Physiol. Chem., 85, 203

FISCHER, F. G., LEHMANN, ECHTERNACHT, H., 1943

aus: KUNITZ, M. "The crystalline Deoxyribonuclease digestion of Thymus-DNA"

Z. Physiol. Chem., 278, 143

FURBERG, S., 1952

"On the structure of Nucleic Acids"

Acta Chem Scand., 6, 634

GASSNER, F. X. HILL, H. J., SULZBERGER, L., 1952

"Relationship of seminal fructose to testis function
in the domestic animal"

Fertil. and Steril., 3, 121-140

GASSNER, F. X., HOPWOOD, H. L., 1953

in "Mammalian germ cells"

Ciba Found. Symp., Boston 18

GEIGY, J. R., AG, 1960

"Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen"
6. Aufl., S. 170

GREENSTEIN, J. P., JENRETTE, W. G., 1940

"Chemical studies on the components of normal
and other tissues"

J. Nat. Cancer Inst., 1, 77

HOPWOOD, H. L., RUTHERFORD, E. R. GASSNER, F. X., 1956

"The concept of fructose utilization by bull sperm
and its relation to fertility"

J. Dairy Sci., 39, 51

JORDAN, D. O., 1954

"Physical properties of Nucleic Acids"

in "Nucleic Acids", CHARGAFF, DAVIDSON
Vol. I, S. 489

JOSSE, J., KAISER, A. D., KORNBERG, A., 1961

"Enzymatic synthesis of Deoxyribonucleic Acid, VIII. Frequences of nearest neighbour base sequences in Deoxyribonucleic Acid"

J. Biol. Chem. 236, 864

KAHLER, H., 1948

"The diffusion and sedimentations of Sodium Thymonucleate"

J. Phys. u. Kolloidchem. 52, 676

KARG, H., GASSNER, F. X., 1961

"Versuche zur Charakterisierung der Ascorbinsäurekonzentration in Eber- und Bullensperma"

Tätigk.ber. d. IV. internat. Kongr. über Ftpfl. d. Tiere, Den Haag, S. 256

KARLSON, P., 1961

"Lehrbuch der Biochemie"

Thieme-Verlag, Stuttgart

KAY, E. R. M., SIMMONS, N. S., DOUNCE, A. L., 1952

"An improved preparation of Sodium Desoxyribonucleate"

J. Am. Chem. Soc., 74, 1724

KOSSEL, A., NEUMANN, A., 1894

"Arch. Anat. u. Physiol "

Ber. 27, 2215

KUNITZ, M., 1950

"The crystalline Deoxyribonuclease digestion
of Thymus-DNA"

J. Gen. Physiol. 33, 349, 363

KURNICK, N. B., 1953

"DNase activity of sera of man and some other
species"

Arch. Biochem. and Biophys., 43, 97

LALAND, S. G., LEE, W. A., OVEREND, W. G., PEACOCKE, A. R., 1954

"The ultravioletabsorption of some degraded
Desoxyribonucleic Acids"

Biochim. et Biophys. Acta, 14, 356

LANG, K., SIEBERT, E., BALDUE, J. CORBET, A., 1950

"Über das Vorkommen von Desoxyribonuclease
und Kathepsin in Zellkernen aus Nieren"

Experientia, 6, 59

LARDY, H. A., 1953

"Controlling of metabolism in mammalian
spermatozoa"

Ciba Found. Symp. S. 59

Little, Brown u. Co., Boston

LARSON, B. L., SALISBURY, G. W., 1953

"The reactive reducing components of semen:
The presence of sulfite in bovine semen"

J. Bio. Chem., 201, 601

LASKOWSKY, M., SEIDEL, M. K., 1946

"Viscosimetric determination of
Thymonucleodepolymerase"

Arch. Biochem. 7, 465

LASKOWSKY, M., STEBERL, E. A., AKKA, R., WATSON, P., 1954

"Partial purification of DNase II from Thymus"

Biochem. et Biophys. Acta, 13, 595

LASKOWSKY, M., GARILE, M. PRIVAT de, 1964

"Evidence for different specificities of DNase I
and DNase II"

Biochim. et Biophys. Acta, 14, 147

LEIDL, W., BERCHTOLD, H., 1961

"Zur Frage der Spermienlagerung in Samenleiter
und Samenleiterampulle beim Bullen"

Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr., 74, 305

LIPSHIZ, R., CHARGAFF, E., 1960

"Studies on the fractionation of Ribonucleic Acid"

Biochim. et Biophys. Acta, 42, 544

LUTWAK-MANN, C., MANN, T. 1948

"Studies on the metabolism of semen"

Biochem. J., 43, 266

LUTWAK-MANN, C., ROWSON,

"The chemical composition of the presperm
fraction of bull ejaculate obtained by electrical
method"

J. agr. Sci., 43, 131

MANN, T. 1946

in "Untersuchung zur Biochemie des menschlichen
Spermaplasma" von C. Schirren

Proceed. on Fertil. and Steril., 1961, S. 325

MANN, T., HUMPHERY, G. F., 1949

"Studies on the metabolism of semen"

Biochem. J., 44, 97 - 105

MANN, T., PERSONS, U., 1950

"Studies on the metabolism of semen"

Biochem. J., 46, 440 - 450

MANN, T., 1954

"The biochemistry of semen"

Methuen u. Co. Ltd., London

McCARTY, M. D., McLYN, 1946

"Purification and properties of DNase, isolated
from beef pancreas"

J. Gen. Physiol., 29, 123

MAVER, M. E. GRECO, A. E., 1949

"The nuclease activities of cathepsin preparations
from calf spleen and Thymus"

J. Biol. Chem., 181, 861

MERKENSCHLAGER, M. SCHLOSSMANN, K., KURZ, W., 1957

"Ein mechanischer Zellhomogenisator und seine
Anwendbarkeit auf biologische Probleme"

Biochem. Z. 329, 332

MIESCHER, F., 1889

in "Die histochemischen und physiologischen Ar-
beiten von F. Miescher" von F. C. Vogel, Leipzig.
1897

MIRSKY, A. E., RIS, H., 1949

"Variable and constant components of chromosomes"

Nature, London, 163, 666

MIRSKY, A. E., 1951

"The desoxyribonucleic acid content of animal
cell and its evolutionary significance"

J. Gen. Physiol., 34, 451

MIRSKY, E. A. 1963

"Austauschvorgänge zwischen Zellkern und
Zellplasma"

Naturwiss., 7,

OTTO, E., 1958

"Biometrie"

Deutscher Bauernverl., Berlin

PAULING, L., COREY, R. B., 1953

"Structure of the Nucleic Acids"

Nature, 171, 346

POUJET, J., 1952

"Etude de la viscosité des solutions diluées de
désoxyribonucléate de sodium"

Compt. rend. Acad. Sci., Paris, 234, 152

REDENZ, E., 1925

"Investigations of the functional morphology
of the epididymidis"

Arch. Entw. org. 106, 290

RÖDEL, L., 1955

"Beitrag zum Mechanismus der Spermienreifung
im Nebenhoden"

Fortpfl., Zuchthyg. u. Hst.besam., 5, 1

SALISBURY, G. W., 1957 c

"The function of the epididymis of the bull.
I. A Theory for the activation of spermatozoa
motility"

Tijdschr. Diergeneeskunde, 13, 1, Juli

SALISBURY, G. , W. , Van DENMARK, N. L. , 1961

"Semen and its components, Physiology of
reproduction and artificial insemination of cattle"

Freemann u. Co. , San Francisco u. London

SCOTT, T. W. , WALES, J. G. , WALLACE, J. C. , WHITE, J. G. , 1963 a

"Composition of ram epididymal and testicular
fluid and the biosynthesis of glycerylphosphorylcholine
by the rabbit epididymidis"

J. Reprod. Fertil. , 6, 49

SHACK, J. JENKINS, R. J. , THOMPSETT, J. 'M. , 1953

"The interaction of ions and deoxypentose
nucleic acid of calf thymus"

in "Nucleic Acids", Vol. I. S. 488

von CHARGAFF u. DAVIDSON, Acad. Press New York

SCHERSTEN, B. , 1936

"Studies on the occurance and biological importance
of Citrates in the sexuel glands of man and various
animals"

Skand. Arch. Physiol. , 74, IX. 3-144

SCHMIDT, G. , LEVENE, P. A. , 1938

"Ribonucleodepolymerase (The Jones-Dubos enzymes)"

J. Biol. Chem. , 126, 423

SIEBERT, G. , LANG, K. , CORBET, A. , 1950

"Über das pH-Optimum der DNase verschiedener
Tierarten"

Biochem. Ztschr. , 320, 418

TAMM, C., SAPHIRO, H., S., CHARGAFF, E., 1952

"Correlation between the action of pancreatic
DNase and the nature of its substrates"

J. Bio. Chem., 199, 313

THOMAS, R., 1954

"Recherches sur la dénaturation des acides
désoxyribonucléiques"

Biochim. et Biophys. Acta, 14, 231

VENDRELEY, R., 1954

"The deoxyribonucleic Acid content of the nucleus"

in: "Nucleic Acids", Vol. II siehe SHACK, J.

WALDSCHMIDT, M., KARG, H., SCHAMS, D., 1963

"Beiträge zur Physiologie der Reifung und des
Alterns von Spermien. I. Mitteilung Besonder-
heiten des Stoffwechsels von Spermien aus Nebenhoden-
schwanz (Cauda epididymidis) und Samenleiterampulle
(Ampulla ductus deferentis) des Rindes"

Z. bl. f. Vet. med., A 1, 1

WALDSCHMIDT, M., KARG, H., HOFFMANN, B., 1964

"Proteolytische Aktivität in männlichen Geschlechts-
sekreten des Rindes"

Naturwiss. Mitt. 51, 18

WATSON, J. D. CRICK, 1953

"Molecular structure of Deoxypentose nucleic Acids"

Nature, London, 171, 737

WHITE, J. G., WALES, R. G., 1961

"Composition of epididymal and ejaculated semen of the ram"

J. Reprod. Ferti., 2, 225

WHITE, M., 1961

"The chromosomes"

Edit. 5, Methuen Ltd. London

WYATT, G. R., 1951

in: "Nucleic Acids", Vol. I, s. 466:

The Purin and Pyrimidin composition of Desoxypentose Nucleic Acids.

The Nucleic Acids, Acad. Press, New York

ZAHMENHOF, S., CHARGAFF, E., 1949

"Studies on the Desoxypentose nuclease of Yeast and its specific cellular regulation"

J. Biol. Chem., 180, 714

ZAHMENHOF, S., SHETTLES, L. B., CHARGAFF, E., 1950

"Human Desoxypentose Nucleic Acids.
Isolation of Desoxypentose Nucleic Acid from human sperm."

Nature, London, 165 757

ZITTLE, C. A., O'DELL, R. A., 1941

"Chemical studies of bull spermatozoa"

J. Biol. Chem., 140, 899

Dem Vorstand des Instituts für Physiologie und Ernährung der Tiere an der Tiermedizinischen Fakultät der Ludwig - Maximilian - Universität München, Herrn Professor Dr. Dr. Johannes BRÜGGEMANN, erlaube ich mir für die großzügige Unterstützung und Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten besonderen Dank zu sagen.

Ebenso gilt mein Dank auch Fräulein Dr. rer. nat. M. WALDSCHMIDT, sowie Herrn Universitätsdozent Dr. H. KARG für wissenschaftliche Anregungen.

Lebenslauf

Am 13. Februar 1934 wurde ich, Martin Kinzler, als Sohn des Pfarrers Hermann Kinzler und seiner Frau Cornelia, geb. Sigel in Kirchheim unter Teck geboren. Nach dem Besuch der Grundschule von 1940 bis 1944 trat ich in das Gymnasium der Stadt Kirchheim unter Teck ein, wo ich 1953 die Reifeprüfung ablegte. Im Frühjahr 1954 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Justus-Liebig-Hochschule in Giessen, das ich 1956 an der Ludwig-Maximilian-Universität in München und an der Tierärztlichen Hochschule in Wien fortsetzte. Nach dreijähriger Unterbrechung von 1959 bis 1962 beendete ich das Studium im Frühjahr 1963 mit dem Staatsexamen an der Universität München.

